

**Untersuchungen zum Einfluss von
Darmfermentationsprodukten auf ausgewählte Gene und
Proteine mit Bedeutung für die Chemoprävention und
Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms in
humanem Kolongewebe**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena



von

Dipl.-Troph. Franziska Jahns

geboren am 24.08.1982

in Altenburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Michael Glej, Jena
2. Prof. Dr. Karl Otto Greulich, Jena
3. Prof. Dr. Siegfried Knasmüller, Wien

Tag der öffentlichen Disputation: 30.01.2014

Inhalt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Kolorektales Karzinom.....	2
1.1.1 Inzidenz und Mortalität weltweit und national.....	2
1.1.2 Risikofaktoren und protektive Einflüsse	2
1.1.3 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese.....	4
1.1.4 Ausgewählte tumorrelevante Proteine und ihre Bedeutung für die Entwicklung von Kolorektalkarzinomen	9
1.2 Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms	17
1.2.1 Ballaststoffe und ihre intestinalen Fermentationsprodukte.....	19
1.2.2 Inulin-artige Fruktane	21
1.3 Zielstellung der Arbeit	22
2 Publikationen	24
2.1 Publikation I: Defensin alpha 6 (<i>DEFA 6</i>) overexpression treshold of over 60 fold can distinguish between adenoma and fully blown colon carcinoma in individual patients. Mariya Y Radeva, Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Michael Glej, Utz Settmacher, Karl Otto Greulich, Henning Mothes. <i>BMC Cancer</i> , 2010; 10:588-93.	24
2.2 Publikation II: Butyrate suppresses mRNA increase of osteopontin and cyclooxygenase-2 in human colon tumor tissue. Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Nadja Jablonowski, Henning Mothes, Mariya Radeva, Anja Wölfert, Karl Otto Greulich, Michael Glej. <i>Carcinogenesis</i> , 2011; 32(6):913-20.	31
2.3 Publikation III: Impact of butyrate on PKM2 and HSP90 β in human colon tissues of different transformation stages: a comparison of gene and protein data. Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Karl Otto Greulich, Mariya Radeva, Anja Wölfert, Michael Glej. <i>Genes & Nutrition</i> , 2012; 7(2):235-46.....	40
2.4 Publikation IV: Butyrate modulates antioxidant enzyme expression in malignant and non-malignant human colon tissues. Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Nadja Jablonowski, Henning Mothes, Karl Otto Greulich, Michael Glej. Eingereicht bei <i>Molecular Carcinogenesis</i> am 24.04.2013.....	53
3 Weitere Ergebnisse	79
3.1 Veränderung des SCFA-Profiles nach In-vitro-Fermentation von Synergy1 [®]	79
3.2 Zytotoxizität von <i>in vitro</i> fermentiertem Synergy1 [®]	80

3.3	Basale Expression der GST-Isoformen P1 und M2 sowie GST-Gesamtaktivität in normalem und malignem Kolongewebe	81
3.4	Einfluss von Butyrat und <i>in vitro</i> fermentiertem Synergy1® auf die Expression von GSTP1 und GSTM2 sowie die GST-Gesamtaktivität in normalem und malignem Kolongewebe.....	83
3.5	Einfluss von <i>in vitro</i> fermentiertem Synergy1® auf die Gen-Expression von COX-2, OPN, PKM2, HSP90β sowie CAT und SOD2 im humanen Kolongewebe	87
3.6	Einfluss von Butyrat auf die alpha-Defensin mRNA-Expression im Normal- und Tumorgewebe des humanen Kolons	88
3.7	Modulation der Aktivität von SOD1 durch Butyrat im humanen Kolon	90
4	Diskussion	93
4.1	Basale Expression ausgewählter Gene in humanen Kolontumoren	93
4.1.1	DEFA6-Expression im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Tumore	94
4.1.2	Korrelation der mRNA-Expression mit dem Stadium und dem Differenzierungsgrad (Grading) der Tumore.....	96
4.1.3	Korrelation der mRNA-Expression ausgewählter Gene oder der Enzymaktivität mit dem Alter der Patienten	96
4.1.4	Korrelation der mRNA-Expression ausgewählter Gene mit dem Geschlecht der Patienten	98
4.2	Einfluss von Darmfermentationsprodukten auf die Expression ausgewählter Gene in humanem Kolongewebe <i>ex vivo</i>	98
4.2.1	Modulation von OPN, COX-2 und PKM2 im Tumorgewebe.....	98
4.2.2	Modulation von Stress- und Entgiftungsenzymen im normalen Kolonepithel	104
4.2.3	Modulation der alpha-Defensin Expression	110
4.3	Korrelation der mRNA- und Proteinexpression ausgewählter Gene im humanen Kolongewebe.....	112
4.3.1	Korrelation der basalen mRNA- und Proteinexpressionswerte	112
4.3.2	Korrelation der Veränderungen auf mRNA- und Proteinebene im Kolongewebe nach Butyrat-Inkubation	113
4.4	Zusammenfassende Schlussfolgerungen	115
4.5	Ausblick	119
5	Zusammenfassung	120
6	Abstract.....	122
7	Literaturverzeichnis.....	IX

Anhang	XXX
Lebenslauf.....	XXXI
Publikationen	XXXII
Danksagung	XXXIII
Selbstständigkeitserklärung	XXXIV

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Molekulare Pathogenese des sporadischen Kolonkarzinoms.....	5
Abb. 2:	Die verschiedenen Phasen der Krebs-Chemoprävention und mit ihr assoziierte Mechanismen.....	18
Abb. 3:	Zytotoxizität des Synergy1®- und Fäzeskontrollüberstandes (Blank) in normalen Kolonzellen nach 1, 4 und 12 h.....	81
Abb. 4:	Basale Expression der GSTP1 und GSTM2 sowie Gesamtaktivität von GSTs im Kolongewebe individueller Spender.....	83
Abb. 5:	Einfluss von Butyrat und komplexen Fermentationsüberständen auf die Expression der GSTP1 in verschieden transformierten Kolongeweben..	84
Abb. 6:	Einfluss von Butyrat und komplexen Fermentationsgemischen auf die Expression von GSTM2 in verschieden transformierten Kolongeweben..	85
Abb. 7:	Einfluss von Butyrat und komplexen In-vitro-Fermentationsüberständen auf die GST-Gesamtaktivität in Tumor- und tumorfreiem Kolongewebe.	86
Abb. 8:	Einfluss von FÜ Synergy1® (10 %) auf die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene in gepaartem Normal-, Adenom und/oder Tumorgewebe des Kolons im Vergleich zu Butyrat (10 mM).....	88
Abb. 9:	Einfluss von Butyrat auf die Genexpression von alpha-Defensinen im Normal- und Tumorgewebe des Kolons individueller Spender..	89
Abb. 10:	Basale SOD-Aktivität in (A) Kolonadenomen und (B) -karzinomen im Vergleich zum normalen Kolonepithel..	91
Abb. 11:	Modulation der SOD-Aktivität durch Butyrat im malignen und nicht-malignen Kolongewebe.....	92
Tab. 1:	Konzentrationen und molare Verhältnisse von SCFAs im Fäzeskontroll (Blank)- und Synergy1®-Fermentationsüberstand (Syn1) nach In-vitro-Fermentation ..	79
Tab. 2:	Primersequenzen für die qPCR und Größe der Amplifikate	XXX
Tab. 3:	Temperaturprofil der qPCR§	XXX

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
AICR	American Institute for Cancer Research
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AP-1 bzw. 2	Aktivatorprotein 1 bzw. 2
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
bp	Basenpaar(e)
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CAT	Katalase
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
C-Myc	Transkriptionsfaktor C-Myc
CoA	Coenzym A
COX-2	Cyclooxygenase-2
DCC	Deleted in colorectal cancer
DEFA	alpha-Defensine (Gen-Name; siehe auch HNP und HD)
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Ets	E26 transformationsspezifisch
FAK	Focal adhesion kinase
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FÜ	Fermentationsüberstand
GST	Glutathion S-Transferase
GDP/GTP	Guanosin-5'-Diphosphat/ Guanosin-5'-Triphosphat
GUS	β-Glucuronidase
HD	Humanes Defensin (Protein-Name für die enterischen alpha-Defensine 5 und 6)
HNP	Humane neutrophile Peptide (Protein-Name für die alpha-Defensine 1-3)
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP90β	Hitzeschockprotein 90 beta
IL	Interleukin
K-ras	Kirsten rat sarcoma
LOH	Loss of heterozygosity, dt. <i>Verlust der Heterozygotität</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK	Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
kinase	
MLH-1	mutL homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatur
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
n	Anzahl der Spender
NaCN	Natriumcyanid

NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NOXA	lateinisch für <i>Schaden</i> , synonym: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NSAIDs	Nicht-steroidale anti-inflammatorische Drogen
OPN	Osteopontin
p21	21 kDa Protein (synonym: Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A)
p53	Tumorprotein 53
Pea3	Polyomavirus enhancer activator 3
PG	Prostaglandin(e)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKM 1/2	Pyruvatkinase, Typ M1 oder M2
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
qPCR	quantitative real-time PCR
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
SCFA	short chain fatty acids, dt. kurzkettige Fettsäuren
SODs	Superoxiddismutasen
SOD1 bzw. 2	Superoxiddismutase 1 bzw. 2
Sp1	Specificity protein 1)
t _½	Halbwertszeit
Tcf/Lef	T-cell factor/Lymphoid enhancer factor
WCRF	World Cancer Research Fund

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist weltweit eine der am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen bei Männern und Frauen und darüber hinaus eine der wichtigsten krebsbedingten Todesursachen. Da der Zeitpunkt der Diagnosestellung und Behandlung wie bei vielen Krebsarten eine entscheidende Rolle spielt, existiert seit den 70er Jahren in Deutschland ein gesetzliches Früherkennungsprogramm, welches mit gezielten Maßnahmen wie dem Hämokult-Test oder der Koloskopie auf eine frühzeitige Identifizierung prä-maligner Vorstufen zielt ⁽¹⁾. Ergänzend kann das Risiko der Erkrankung, welches altersbedingt steigt, durch eine gesunde und ausgewogene Ernährungs- und Lebensweise maßgeblich beeinflusst werden. Ballaststoffe stehen dabei seit Jahrzehnten im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Ein regelmäßiger Verzehr dieser unverdaulichen Kohlenhydrat-Polymere ist hierbei mit einer Risikoreduktion für maligne Tumore des Kolons und des Rektums assoziiert ⁽²⁾. Nationale und internationale Expertengremien empfehlen eine Aufnahme von mindestens 25 g/d ^(3,4). Von den kurzkettigen Fettsäuren, die aus dem bakteriellen Abbau der Ballaststoffe im Dickdarm hervorgehen, werden insbesondere dem Butyrat anti-kanzerogene Effekte zugeschrieben. Viele der für Butyrat beschriebenen Einflüsse wurden anhand von Tumorzellmodellen oder Tierstudien demonstriert und auf dessen gen-regulierende Aktivität zurückgeführt ^(5,6). Zur Empfindlichkeit des normalen oder malignen Kolongewebes existieren dagegen bisher nur wenige Daten. Um dieses Wissen zu erweitern, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig der Einfluss von Butyrat und ferner eines komplexen *in vitro* fermentierten Inulin/Oligofruktose-Gemisches (Synergy1[®]) auf eine Auswahl an Genen und deren dazugehörige Proteine mit Bedeutung für die Prävention und/oder Progression kolorektaler Tumore in primärem Kolongewebe unterschiedlichen Transformationsgrades charakterisiert. Dabei konnten nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern und Geweben nachgewiesen werden, sondern auch eine differenzielle Regulation der Expression von Genen, die in zelluläre Prozesse wie der Abwehr von Stress, der Glykolyse, der Immunabwehr, der Entgiftung sowie der Entzündung und Zelladhäsion involviert sind. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass die Stärke der Korrelation der mRNA- und Proteinveränderungen nach Butyrat-Inkubation der Gewebe für die untersuchten Zielgene variiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich unter Verwendung von primärem humanen Kolongewebe mit unterschiedlichem Transformationsgrad generiert. Eine weitere Besonderheit stellt hierbei die Tatsache dar, dass es sich bei dem Gewebematerial um gepaarte Normal-, Adenom- und/oder Tumorgewebeproben handelt, die von jeweils einem Patienten stammen. So hat der relativ große Untersuchungsumfang zur Charakterisierung eines relativ kleinen Probandenkollektivs (≤ 20 Patienten je

untersuchten Parameter) geführt. Dieses gewährt jedoch im Vergleich zu anders angelegten Studien mit Ausrichtung auf Maximierung der Probandenzahlen wichtige Einblicke in die individuelle Variabilität hinsichtlich der Reaktion des Darmepithels auf Fermentationsprodukte. Während Studien mit einer höheren Anzahl an Teilnehmern oftmals auf die experimentelle Untersuchung nur weniger Versuchsparameter konzentriert sind, konnte mit dem zur Verfügung stehenden Probenmaterial dieser Arbeit eine deutlich größere Anzahl an Endpunkten gleichzeitig untersucht werden.

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Inzidenz und Mortalität weltweit und national

Im Jahr 2008 wurden weltweit über 1 Million neue Fälle an Dickdarmkrebs verzeichnet, die insgesamt 10 % aller Krebsneuerkrankungen ausmachten. Bei Männern stellt das kolorektale Karzinom nach Lungen- und Prostatakrebs die dritthäufigste maligne Erkrankung dar, während bei Frauen nur der Brustkrebs häufiger auftritt. Fast 60 % aller Kolorektalkrebsfälle wurden in industrialisierten Ländern mit westlichem Lebensstandard verzeichnet. Die höchsten Neuerkrankungsraten weisen dabei Australien/Neuseeland und Westeuropa auf. Afrika (ausgenommen Südafrika) und Süd-Zentral-Asien haben hingegen die niedrigsten Inzidenzen ⁽⁷⁾.

Krebserkrankungen des Kolons und Rektums bedingen ferner 8 % der Krebstodesfälle weltweit. Bei den Männern war das kolorektale Karzinom im Jahr 2008 die vierthäufigste Krebstodesursache mit über 300 000 Fällen und bei Frauen die dritthäufigste mit knapp 290 000 Fällen. Zentral- und Osteuropa verzeichneten dabei die höchsten Sterberaten, während die niedrigsten in Mittelfrika zu beobachten waren ⁽⁷⁾.

Deutschland besitzt im internationalen Vergleich neben den Niederlanden und Dänemark eine der höchsten altersstandardisierten Neuerkrankungsraten für Kolorektalkrebs. Im Jahr 2008 erkrankten in der Bundesrepublik etwa 35 000 Männer und 30 000 Frauen neu an dieser Krebsart. Maligne Tumore des Kolons und des Rektums stehen damit an zweiter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen und sind ebenso nach Lungen (Männer)- und Brustkrebs (Frauen) eine der wichtigsten Ursachen krebsbedingter Todesfälle. Während bei den Frauen in den letzten 10 Jahren (1999-2008) eine rückläufige Inzidenz verzeichnet werden konnte, blieb die der Männer eher stabil. Die Sterberaten sind jedoch bei beiden Geschlechtern um mehr als 20 % gefallen, was u. a. auf die verbesserten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zurückzuführen ist ⁽⁸⁾.

1.1.2 Risikofaktoren und protektive Einflüsse

Rund 30 % aller Dickdarmkrebsfälle werden durch erbliche Faktoren bedingt. Ein geringer Anteil (5 %) geht dabei auf vererbte Genveränderungen zurück, die gut charakterisiert

sind und u. a. zu Krankheitsbildern wie die des Lynch-Syndroms (auch hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom, HNPCC) und der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) führen. Bei der Mehrheit (25 %) sind die genetischen Ursachen bislang jedoch nicht bekannt. Diese Fälle werden aufgrund ihres ebenso familiären Hintergrundes deshalb als familiärer Dickdarmkrebs bezeichnet. Ursächlich hierfür sind vermutlich mehrere Genvarianten, die neben Umweltfaktoren das Risiko für die Entwicklung kolorektaler Tumore erhöhen. Die meisten Darmkrebserkrankungen (70 %) treten jedoch ohne eine erbliche Ursache (sporadisch) auf ⁽⁹⁾. Dabei steigt das Risiko der Erkrankung mit zunehmendem Alter ⁽¹⁰⁾. Mehr als die Hälfte aller Betroffenen sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits jenseits des 70. Lebensjahres ⁽⁸⁾. Ferner gelten das Geschlecht ⁽¹¹⁾ und die Disposition einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, wie beispielsweise Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, als Risikofaktoren ⁽¹²⁾. Vor allem aber die Ernährung und der Lebensstil beeinflussen nachweislich das Risiko der Erkrankung. Ein gesicherter Zusammenhang besteht laut World Cancer Research Fund (WCRF)/American Institute for Cancer Research (AICR) zwischen der Entstehung von Dickdarmkrebs und dem Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch, Alkohol (bei Männern), Übergewicht und einer größeren Körperhöhe, die einzeln das Risiko für die Erkrankung erhöhen. Körperliche Aktivität hat hingegen einen risikominimierenden Effekt ⁽⁴⁾. Unter den nahrungsrelevanten Faktoren werden seit mehr als 30 Jahren Ballaststoffe und ihre potenzielle Bedeutung für die Prävention des kolorektalen Karzinoms diskutiert. Die European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Studie ist mit über 500 000 Teilnehmern aus 10 europäischen Ländern eine der bisher größten prospektiven Kohortenstudien ⁽¹³⁾ und stellte neben anderen Untersuchungen eine inverse Beziehung zwischen Ballaststoffaufnahme und dem Risiko für kolorektale Tumore fest. Ergebnisse aus neueren Kohortenstudien, die im Rahmen eines fortlaufenden Projekts des WCRF/AICR in die Analyse zum Einfluss von potenziellen Risikofaktoren und protektiven Faktoren auf die Kolonkarzinogenese eingegangen sind, unterstützen diese Aussage und führten im Jahr 2011 zu einer Einstufung ballaststoffhaltiger Lebensmittel in die Kategorie „überzeugend“ ⁽²⁾. Die aktualisierte Meta-Analyse, die u. a. jüngst publizierte Daten der EPIC-Studie ⁽¹⁴⁾ enthielt, zeigte eine Reduktion des Risikos für kolorektale Tumore um 10 % bei einer Aufnahme von 10 g Ballaststoffen pro Tag. Eine inverse Beziehung konnte ebenso durch eine von Dahm *et al.* ⁽¹⁵⁾ publizierte Meta-Analyse belegt werden. Diese hatte Daten mehrtägiger Ernährungsprotokolle von Probanden mehrerer englischer Kohortenstudien im Gegensatz zu den meist verwendeten Lebensmittel-Häufigkeitsfragebögen zugrunde gelegt. Daneben existieren allerdings auch Studien mit konträren Ergebnissen, wie beispielsweise die von Park *et al.* ⁽¹⁶⁾ oder Michels *et al.* ⁽¹⁷⁾, die den Zusammenhang

zwischen Ballaststoffaufnahme und der Reduktion des Risikos für kolorektale Tumore in Frage stellen. Ballaststoffhaltige Lebensmittel galten aufgrund der unklaren Datenlage deshalb bis zur Veröffentlichung des sogenannten „Continuous Update Project Report on Colorectal Cancer“ lange Zeit nur als „wahrscheinlich schützend“⁽⁴⁾.

Neben der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Ballaststoffaufnahme und dem Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, konzentrieren sich andere Studien ferner auf den Effekt einer Nahrungsmittelumstellung zur Vermeidung des Wiederauftretens von Adenomen (Rezidiv-Bildung). Diese gelten als kritische Zwischenstufen, da sich mehr als 90 % der Tumore daraus entwickeln⁽¹⁸⁾. Innerhalb der als „Poly Prevention Trial“ bezeichneten Studie an 2 000 Teilnehmern und ihrer Folge-Studie⁽¹⁹⁾, die weitere 4 Jahre umfasste, hatte eine Ernährung mit wenig Fett, hohem Ballaststoff- sowie Obst- und Gemüseanteil insgesamt keinen Einfluss auf das Risiko für wiederkehrende Adenome im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine inverse Beziehung zwischen Diät und Rezidiv-Bildung ließ sich interessanterweise aber bei den Studienteilnehmern finden, die nahezu über die gesamte Studiendauer die festgelegten Ernährungsziele, wie z. B. eine auf max. 20 % begrenzte Energiezufuhr in Form von Fett, eine Aufnahme von 18 g Ballaststoffen und 3,5 Portionen an Obst und Gemüse pro 1 000 kcal, erreicht hatten („Super Compliers“)⁽²⁰⁾. Das Risiko konnte hierbei um 35 % vermindert werden.

1.1.3 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese

Die Entwicklung maligner Tumore ist ein mehrstufiger, über mehrere Jahrzehnte dauernder Prozess, der überwiegend durch die Akkumulation somatischer Mutationen in Tumorsuppressorgenen, aber auch Protoonkogenen bedingt ist⁽²¹⁾. Laut Wood *et al.*⁽²²⁾ weist ein malignes Kolonkarzinom etwa 80 Mutationen auf, von denen weniger als 15 für die Entstehung von Tumoren verantwortlich zu sein scheinen. Nur wenige dieser Veränderungen sind jedoch mehrheitlich bei Kolonkarzinom-Patienten nachweisbar. Die meisten Gene sind bei weniger als 5 % der Tumore mutiert und verleihen jedem Tumor damit ein individuelles Profil.

Der Prozess der Karzinogenese erfolgt über die Stufen der Initiation, der Promotion und der Progression. Die Initiation repräsentiert dabei den ersten Schritt der Tumorgenese und wird durch eine Mutation in einer replikationsfähigen Zelle (Stammzelle oder partiell differenzierte Tochterzelle) ausgelöst. Diese genetische Variation kann in einem Wachstumsvorteil für die betroffene Zelle resultieren, führt aber zu keiner sichtbaren Veränderung des Gewebes. Da dieses initiale Ereignis nicht tumorigen ist, müssen Veränderungen in der Zellumgebung stattfinden (z. B. chronische Entzündung) und weitere Mutationen in tumorrelevanten Genen (z. B. Tumorsuppressorgene, Protoonkogene) akkumulieren, um die zelluläre Proliferation zu erhöhen und damit die Entwicklung von Adenomen (Promotion) und Karzinomen (Progression) zu fördern. Die

weitere Anpassung von Zellen an hypoxische und azidotische Bedingungen, die durch die Expansion des Tumors bedingt sind, führen schließlich zur Entwicklung eines malignen Karzinoms mit unbegrenztem und invasivem Wachstumsverhalten⁽²³⁻²⁵⁾. Neben diesen typischen Eigenschaften weisen Krebszellen des Weiteren einen veränderten metabolischen Phänotyp auf und sind in der Lage, einer Beseitigung durch das Immunsystem zu entgehen⁽²⁶⁾.

Der Erwerb dieser funktionellen Eigenschaften, welche Tumorzellen ihr Wachstum und Überleben sowie ihre Verbreitung sichern, wird zum einen durch die genomische Instabilität und zum anderen durch tumorbegleitende Entzündungsprozesse ermöglicht⁽²⁶⁾. Fearon und Vogelstein postulierten vor gut zwei Jahrzehnten ein Modell der Kolonkarzinogenese, welches häufig vorkommende genetische Abnormalitäten mit den verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung assoziiert⁽²¹⁾ (Abb. 1A). Obwohl Adenome nur ein geringes Risiko tragen maligne zu werden, gehen mehr als 90 % der Tumore aus adenomatösen Polypen hervor. Der Rest der Karzinome entwickelt sich scheinbar ohne eine adenomatöse Vorstufe. Risikofaktoren für die Entartung stellen die Anzahl, Größe, Histologie sowie die Form der Polypen dar^(18,27).

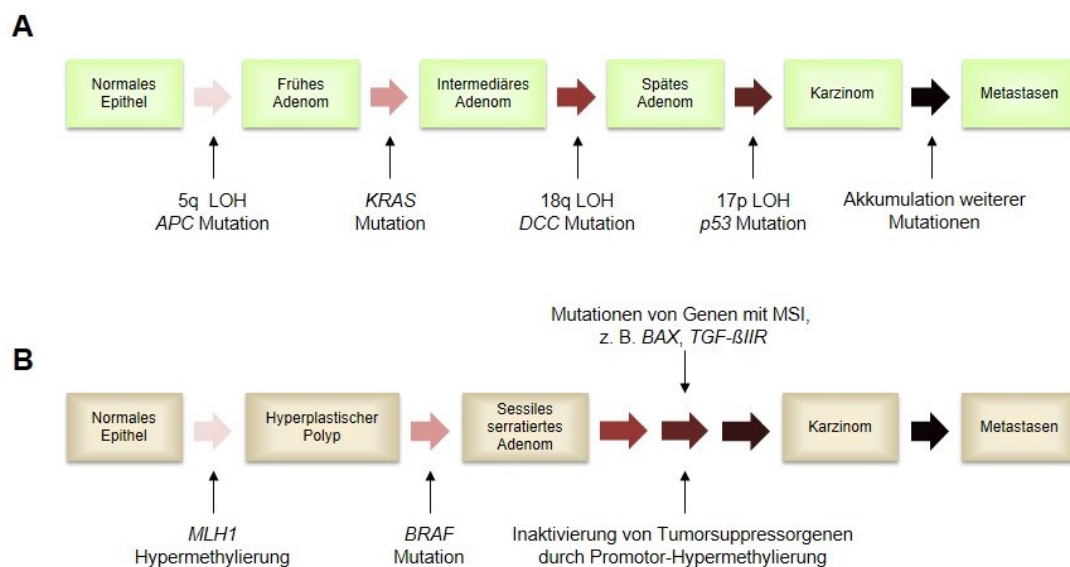


Abb. 1: Molekulare Pathogenese des sporadischen Kolonkarzinoms. (A) Die Mehrzahl kolorektaler Tumore entwickelt sich über adenomatöse Polypen im Verlauf eines Jahrzehnte dauernden Prozesses. Der Tumor-Initiation und Progression liegt dabei eine stufenweise Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressor- und Protoonkogenen sowie ein Verlust von genetischem Material zugrunde (LOH) („chromosomaler Instabilitätsweg“). (B) Weniger als 15 % der Tumore sind hingegen durch eine Inaktivierung des Mismatch-Reparatur (MMR) Systems gekennzeichnet, die in einer sogenannten Mikrosatelliteninstabilität (MSI) resultiert. Bei diesen Tumoren ist eine Hypermethylierung des *MLH1* (*mutL homolog 1*)-Promotors ursächlich für die Inaktivierung von MMR-Genen. Der Funktionsverlust dieser Proteine ist darüber hinaus auch ein charakteristisches Merkmal von erblichen HNPCC-Tumoren, die an dieser Stelle allerdings keine Berücksichtigung finden. Sporadische, mikrosatelliteninstabile Tumore entwickeln sich über

sessile, serratierte Adenome und weisen ein verändertes Methylierungsmuster in zahlreichen Genen auf. Zudem sind sie häufig durch ein mutiertes *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*)-Gen gekennzeichnet („Mutatorweg“ oder „Epigenetischer Weg“) (modifiziert nach ^(21,28)).

Eine der häufigsten und frühesten Ereignisse in der Kolonkanzerogenese sind Mutationen im *adenomatous polyposis coli* (*APC*)-Gen, die sowohl bei sporadischen als auch vererbten Tumoren von entscheidender Bedeutung sind. Etwa 80 % aller sporadischen Kolonkarzinome besitzen ein mutiertes APC-Protein ^(29,30). APC, dessen Gensequenz auf Chromosom 5q21 lokalisiert ist, wurde als ein „Gatekeeper“ in der initiierten Phase der Tumorentwicklung identifiziert, der bei Verlust zu einer Dysplasie des Darmepithels mit Störungen in zellregulatorischen Funktionen führt ^(31,32). APC agiert in einem Multiprotein-Komplex und bewirkt zusammen mit Axin und der Glykogen-Synthase-Kinase-3- β den Abbau von β -Catenin durch das Proteasom. Mutationen im *APC*-Gen, die beispielsweise zu einem Funktionsverlust des Proteins führen und damit den Abbau von β -Catenin unterdrücken, führen zu einer Translokation von β -Catenin in den Nukleus, wo dieses als Co-Aktivator zusammen mit T-Zell- und Lymphoid enhancer (Tcf/Lef) Transkriptionsfaktoren die Aktivierung von verschiedenen Genen veranlasst. Zu den bekanntesten Zielgenen zählen u. a. Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 und c-Myc sowie Matrixmetalloproteinasen, die in die Tumorprogression involviert sind.

Auch Mutationen des *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*) Gens zählen zu den häufigsten Veränderungen und sind in 50 % der Kolonadenome und -tumore nachweisbar ⁽²⁹⁾. *KRAS* ist ein Protoonkogen, welches auf Chromosom 12p12.1 lokalisiert ist und ein Guanosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein kodiert. Unter normalen Umständen liegt *KRAS* als Guanosindiphosphat (GDP)-gebundene, inaktive Form im Zytosol. Externe Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Mitogene, bewirken eine transiente Aktivierung des Membran-assoziierten Proteins durch den Austausch von GDP gegen GTP und damit die Aktivierung von wachstumsregulatorischen Signalwegen, zu denen u. a. die Ras-Raf-MEK-ERK (Rat sarcoma – Rapidly accelerated fibrosarcoma – Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase kinase – Extracellular signal-regulated kinase) und PI3P-Akt-mTor (Phosphoinositid-3-Kinase – v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 – Mammalian Target of Rapamycin) Signalkaskaden zählen. Mutationen des *KRAS*-Gens resultieren in dem Verlust der GTP-Hydrolysefähigkeit des gleichnamigen Proteins und damit in einer konstitutiven Aktivierung von nachgeschalteten Effektormolekülen, insbesondere der Raf-MEK-ERK Kaskade des Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase Signalweges ^(33,34). Auf funktioneller Ebene sind Mutationen im *KRAS*-Gen mit einer Förderung der

Kolontumorgenese assoziiert, die sich *in vivo* u. a. in einer geringeren Lebensspanne und einer erhöhten Inzidenz von Adenomen äußert ⁽³⁵⁾.

Eine weitere genetische Abnormalität ist der Verlust der Heterozygotie des Chromosomenabschnittes 18q, der bei mehr als 70 % aller kolorektalen Tumore nachgewiesen werden konnte. Mit dem Allelverlust wird der Verlust des Tumorsuppressorgens *deleted in colorectal carcinoma* (DCC) assoziiert, welches in der betroffenen Region lokalisiert ist ⁽²¹⁾. DCC kodiert einen Transmembran-Rezeptor der Immunoglobulin-Superfamilie, der in Abhängigkeit einer Ligandenbindung unterschiedliche zelluläre Signalwege aktiviert ⁽³⁶⁾. In Abwesenheit seines Liganden Netrin-1 induziert DCC als sogenannter *dependence* Rezeptor über die Aktivierung der Caspasen-9 und -3 Apoptose, die unabhängig vom Todesrezeptor/Caspase-8 Signalweg und dem mitochondrialen Apoptoseweg ist. Die Bindung von Netrin-1 bewirkt hingegen eine Induktion anti-apoptischer Signalwege (z. B. PI3K-Akt, MAP-Kinase extrazellulär signal-vermittelter ERK1/2 Signalweg) und fördert das Überleben von Zellen sowie deren Proliferation, Differenzierung und Migration. Durch den Verlust des DCC-Tumorsuppressorgens während der Karzinogenese können intestinale Zellen der regulatorischen Kontrolle entkommen und folglich einen selektiven Wachstumsvorteil erlangen ^(36,37). Neue Untersuchungen unterstützen die Rolle von DCC als Tumorsuppressor, die bisher aus verschiedenen Gründen als umstritten galt ^(38,39). Neben dem Allelverlust spielen auch häufig auftretende Methylierungen der DCC-Promotorregion und somatische Mutationen, welche von untergeordneter Bedeutung sind, eine Rolle bei der Inaktivierung des Rezeptors ^(37,40).

Der Verlust großer Anteile des Chromosoms 17p geht mit einem Verlust des Tumorsuppressors *p53* einher ^(21,41). Etwa 70 % aller kolorektalen Karzinome zeigen einen Verlust der Heterozygotie in diesem Chromosomenabschnitt, während das verbleibende *p53*-Allel meist Träger einer somatischen Mutation ist. Der Allelverlust und die Mutation im *p53*-Gen sind eher späte Ereignisse in dem von Fearon und Vogelstein beschriebenen Modell der Kolonkarzinogenese, die mit dem Übergang von Adenomen in maligne Tumore assoziiert sind ⁽⁴¹⁾. Als Transkriptionsfaktor spielt *p53* eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose. Das Protein führt bei auftretenden DNA-Schäden durch die transkriptionelle Aktivierung von Kinase-Inhibitoren, wie beispielsweise des *p21*-Proteins, zu einem Arrest der Zellen in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus ^(42,43). Bei irreparablen DNA-Läsionen leitet *p53* hingegen apoptotische Prozesse ein, die unter anderem in einer Aktivierung der Caspasen-9 und -3 resultieren. *P53* kann dabei über die Induktion der Expression von Genen der *Bcl2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*)-Familie (z. B. *Bax* (*Bcl2-associated X protein*), *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), *NOXA* (*lat. Schaden*)) und/oder eine Translokation in die

Mitochondrien eine Freisetzung von Cytochrom c bewirken, welches die nachfolgende Caspase-9 Kaskade in Gang setzt. Neben dem intrinsischen Signalweg reguliert p53 auch Gene, die den extrinsischen apoptotischen Signalweg auslösen und in einer Aktivierung der Caspasen-8 und -3 resultieren^(42,44). Die Initiation eines Wachstumsstopps, zellulärer Seneszenz oder Apoptose ist dabei unter anderem von der Art des Stressors, Art und Position der post-translationalen p53-Modifikationen sowie den mit p53-interagierenden Proteinen abhängig⁽⁴²⁾.

Das von Fearon und Vogelstein beschriebene Modell resultiert in chromosomaler Instabilität, die bei 85 % aller sporadischen Tumore auftritt und durch Aneuploidie (numerische Alteration der Chromosomen) und dem Verlust von genetischem Material (Verlust der Heterozygotie) gekennzeichnet ist⁽⁴⁵⁾. Häufig betroffen von Allelverlusten sind dabei die Chromosomenabschnitte 5q, 17p und 18q, die eng mit dem Verlust von Tumorsuppressorgenen assoziiert sind. Dieser molekulare Weg der Kolonkarzinogenese wird daher auch als Suppressorweg oder chromosomaler Instabilitätsweg bezeichnet⁽⁴⁶⁾.

Neben dem genetischen Modell von Fearon und Vogelstein können Tumore des Weiteren über den sogenannten Mutatorweg oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI) entstehen, der bei 15-20 % aller kolorektalen Karzinome vorliegt (Abb. 1B). Ursache ist eine Inaktivierung von Mismatchreparaturgenen, deren Proteine normalerweise Fehler der DNA-Polymerase in Mikrosatelliten-Sequenzen während der Replikation korrigieren⁽⁴⁶⁾. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen, z. B. (A)_n oder (CA)_n, die über das gesamte Genom verteilt sind und sehr anfällig für Basenfehlpaarungen sowie Insertionen/Deletionen von „Repeats“ durch die DNA-Polymerase sind. Eine defekte Mismatch-Reparatur kann diese Fehler nicht mehr korrigieren und führt zum Auftreten von neuen Allel-Längen in Tumoren, die als MSI bezeichnet werden^(47,48). Auf diese Weise häufen sich hunderte bis tausende Leseraster-Mutationen in kodierenden und nicht-kodierenden Mikrosatelliten-Sequenzen an, die charakteristisch für mikrosatelliteninstabile Tumore sind. MSI ist darüber hinaus ebenso ein typisches Merkmal des hereditären, nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms (Lynch Syndrom), das etwa 2-4 % aller kolorektalen Tumore ausmacht. Im Gegensatz zu sporadischen, Mikrosatelliten-instabilen Karzinomen, wo MSI hauptsächlich als Folge einer epigenetischen Inaktivierung durch Hypermethylierung des *hMLH1*-Gens auftritt, ist bei der erblichen Form des Dickdarmkrebses eine Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* oder *hPMS2* ursächlich^(46,49). Die Progression beider Tumore ist mit einer weiteren Inaktivierung von Genen assoziiert, deren kodierende Regionen Mikrosatelliten enthalten und in die Kolonkarzinogenese involviert sind, wie z. B. *Transforming growth factor β Typ II Rezeptor* oder *BAX*. Sporadische hochfrequente MSI-Tumore entwickeln sich häufig aus sessilen serratierten Adenomen und zeigen zusätzlich Mutationen im Protoonkogen *B-Raf* sowie vermehrte Methylierungen im

Bereich von CpG-Inseln in Promotorregionen von Genen, die zu einer Stilllegung bzw. Abschaltung der Transkriptionsaktivität führen („CpG Island Methylation“-Phänotyp) ^(28,50). Neben den molekularen Veränderungen unterscheiden sich hochfrequente MSI-Tumore (sporadisch oder vererbt) im Vergleich zu chromosomal instabilen Tumoren u. a. in der Lokalisation, den klinischen und histopathologischen Eigenschaften sowie der Prognose ⁽⁴⁶⁾.

1.1.4 Ausgewählte tumorrelevante Proteine und ihre Bedeutung für die Entwicklung von Kolorektalkarzinomen

Osteopontin (OPN)

OPN ist ein sekretorisches, glykosyliertes Phosphoprotein, welches in eine Reihe zellulärer Prozesse, wie z. B. der Immunabwehr, der Mineralisation und Resorption von Knochen sowie dem Überleben von Zellen, involviert ist ⁽⁵¹⁾. Als Adhäsionsprotein und Zytokin wird es sowohl von Immun- als auch Nicht-Immunzellen synthetisiert und vermittelt über die Anheftung an verschiedene Integrine und den CD44-Rezeptor Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen ⁽⁵²⁾. Neben seiner physiologischen Funktion ist OPN auch mit der Pathogenese verschiedener entzündlicher und maligner Erkrankungen assoziiert. In der Tumorgenese kolorektaler Karzinome wurde das Adhäsionsprotein als ein Hauptmarker identifiziert, dessen Expression mit dem Tumorstadium positiv korreliert ^(53,54). Eine hohe OPN-Expression gilt u. a. als ein schlechter Prognose-Faktor für das Rückfallrisiko bzw. Überleben von Lungen- und Kolonkrebspatienten ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Die erhöhten Mengen von OPN, die auch in Tumoren der Brust und Lunge ⁽⁵⁸⁾ gefunden wurden, spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Metastasierung von Tumorzellen ⁽⁵⁹⁾. Die Freisetzung des Glykoproteins aus dem Primärtumor bewirkt u. a. im Knochenmark eine Aktivierung von Knochenmarkszellen, die nachfolgend in die Blutzirkulation entlassen werden. Diese wiederum schaffen für vom Primärtumor abgelöste Krebszellen eine „Tumor-freundliche“ Umgebung und unterstützen somit die Entwicklung sekundärer Tumore in anderen Geweben ⁽⁶⁰⁾. Neben dieser „Schlüsselfunktion“ ist OPN auch durch andere Mechanismen, wie der Herunterregulation der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in Makrophagen der lokalen Tumorumgebung ⁽⁶¹⁾ und der Aktivierung von Überlebenssignalen (NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) oder FAK (Focal adhesion kinase)) ⁽⁶²⁾ in entarteten Zellen in das Wachstum von Tumoren involviert. Die Dysregulation der OPN-Expression stellt ein frühes Ereignis in der Karzinogenese kolorektaler Tumore dar und tritt u. a. als sekundäre Folge eines konstitutiv aktivierten Wnt-Signalweges auf ⁽⁶³⁾. Der *OPN*-Promotor besitzt neben Bindungsstellen für c-Myc weitere regulatorische Sequenzen, die beispielsweise Bindungsstellen für Aktivatorprotein 1 (AP-1), p53, Pea3 (Polyomavirus enhancer activator 3) und Ras

beinhalten ⁽⁶³⁻⁶⁵⁾. Auf posttranslationaler Ebene erfolgen zudem Zelltyp-spezifische Modifikationen (Phosphorylierung und O-Glykosylierung), die verschiedene OPN-Isoformen mit unterschiedlicher biologischer Aktivität zur Folge haben ^(66,67).

Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Die Cyclooxygenasen (COX; synonym: Prostaglandin-H-Synthasen) 1 und 2 katalysieren die ersten beiden Schritte in der Biosynthese der Prostaglandine (PG) und wurden als wichtige Zielproteine von nicht-steroidalen, anti-inflammatorischen Medikamenten wie Aspirin oder Ibuprofen bekannt ⁽⁶⁸⁾. Mit Hilfe einer Cyclooxygenase- und Peroxidaseaktivität der Enzyme erfolgt die Umsetzung von Arachidonsäure (AA), welche durch die Phospholipase A2 (PLA2) aus den Zellmembranlipiden freigesetzt wird, zum PG-Endoperoxid H_2 , einem Vorläufer der bioaktiven Prostanoiden (Thromboxan A₂; Prostaglandine PGE₂, PGF_{2 α} , PGD₂ und PGI₂). Diese Moleküle vermitteln aufgrund ihrer flüchtigen Natur (Halbwertszeiten von s bis wenige min) auto- und parakrine Wirkungen über verschiedene PG-Rezeptoren in nahezu jedem Gewebe ⁽⁶⁹⁾.

Während COX-1 vorrangig in die Blutplättchenaggregation, den Schutz des gastrointestinalen Epithels sowie den Geburtsvorgang involviert ist und meist als konstitutiv exprimiertes Enzym beschrieben wird, gilt COX-2 als transient und wird primär mit der Bildung von PG während pathologischer Prozesse wie Entzündung, Schmerz, Fieber oder Tumorgenese assoziiert ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Studienergebnisse haben diese stark vereinfachte Sichtweise jedoch vermehrt widerlegt ^(70,71) und beispielsweise eine konstitutive Expression von COX-2 in den neuromuskulären Anteilen der Dickdarmwand ⁽⁷²⁾ oder dem Gehirn ⁽⁷³⁾ gezeigt. Neben COX-1 und COX-2 wurde auch eine Spleißvariante der COX-1 identifiziert, die als COX-3 bezeichnet wurde mit bislang unbekannter Funktion ⁽⁷⁴⁾.

Die Entwicklung kolorektaler Tumore führt zu einem Anstieg der COX-2 Proteinexpression im Darmepithel (> 70 %) ⁽⁷⁵⁾. Die Expressionshöhe korreliert dabei mit klinischen Charakteristika wie dem Tumorstadium, der Tumorgröße, der Invasionstiefe und Gefäßinfiltration sowie der Rezidivbildung und Überlebensrate ⁽⁷⁶⁾. Histopathologische und genetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass COX-2 bereits eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Polypen bzw. Adenomen spielt ⁽⁷⁷⁾, welche mehrheitlich ebenso erhöhte Gehalte des Proteins aufweisen ⁽⁷⁸⁾.

In Folge der erhöhten COX-2 Expression wird auch dessen wichtigster Metabolit PGE₂ vermehrt von Tumoren exprimiert ⁽⁷⁹⁾. COX-2 bzw. PGE₂ fördern das Tumorstadium durch die Beeinflussung charakteristischer Eigenschaften von Krebszellen ⁽⁸⁰⁾, die von Hanahan und Weinberg definiert und kürzlich erweitert worden sind ⁽²⁶⁾. Eine Hemmung des proinflammatorischen Enzyms geht demnach mit einem verminderten

Tumorstadium, einer erhöhten Tumorzellapoptose, einer verminderten Blutgefäßdichte und Metastasierung sowie einer erhöhten Überlebensrate *in vivo* einher ^(81,82). Die Regulation der COX-2 Expression erfolgt u. a. durch die Wnt- und Ras-Signaltransduktionswege, deren Hyperaktivierung vermutlich zu der konstitutiven Überexpression in Tumoren führt ^(83,84). Der Verlust des APC-Proteins ist sowohl mit einer transkriptionellen Stimulation des COX-2 Promotors als auch mit einer translationalen Steigerung der COX-2 Synthese assoziiert ^(83,85). Mutationen im *Ras*-Gen resultieren hingegen in einer Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen, die neben der Induktion der COX-2 Transkription auch eine Rolle bei der Stabilisierung der COX-2 mRNA spielen ^(84,86,87).

Pyruvatkinase M2 (PKM2)

PKM2 katalysiert als eine von vier Pyruvatkinase(PK)-Isoformen die Übertragung eines Phosphatrestes von Phosphoenolpyruvat auf Adenosindiphosphat unter Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) und Pyruvat. Die Expression der PK-Isoenzyme erfolgt gewebespezifisch in Abhängigkeit der metabolischen Anforderungen. Während PK Typ M1 (PKM1) in den meisten adulten Geweben zu finden ist, ist PK Typ L die Hauptisoform in Leber und Niere und PK Typ R die typische Isoform in Erythrozyten. PKM2 ist hingegen charakteristisch für Lungengewebe und proliferierende Zellen von adulten, embryonalen und insbesondere malignen Geweben ⁽⁸⁸⁾. Alle vier Isoenzyme werden insgesamt von zwei Genen kodiert. Die Transkription von PK Typ R und L, deren genetische Information auf dem *PKL*-Gen liegt, wird durch gewebespezifische Promotoren in unterschiedlichen Exons initiiert. PKM1 und PKM2 stellen jeweils verschiedene Spleißvarianten dar, die durch das *PKM*-Gen kodiert werden ⁽⁸⁹⁾.

Während der Tumorentwicklung tritt eine Änderung der Expression von der gewebespezifischen Isoform hin zu PKM2 ein ^(88,90,91). Das glykolytische Enzym, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Abbau von Glukose katalysiert, existiert in Tumorzellen neben einer tetrameren Form vorrangig als Dimer ⁽⁸⁸⁾. Diese im Gegensatz zum Tetramer katalytisch inaktive Form fördert den in Krebszellen beobachteten Stoffwechsel ⁽⁹²⁾, der u. a. durch eine hohe Laktatbildung selbst bei normaler Sauerstoffzufuhr gekennzeichnet ist (aerobe Glykolyse, Warburg-Effekt) ^(26,93). PKM2 ermöglicht dabei die Bereitstellung von Phosphometaboliten, die aus dem Abbau von Glukose oberhalb der PK-Reaktion stammen, für anabole Prozesse, wie beispielsweise die Synthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren und Phospholipiden ⁽⁸⁸⁾. *PKM2*-exprimierende Zellen erlangen folglich *in vivo* einen Wachstumsvorteil mit einer höheren Anzahl an Tumoren und größerer Tumormasse ^(90,92). Das Tetramer/Dimer-Verhältnis von PKM2 ist allerdings kein konstanter Wert, sondern wird u. a. allosterisch durch Fruktose-

1,6-Bisphosphat sowie verschiedene Aminosäuren und Onkoproteine reguliert ⁽⁸⁸⁾. PKM2 wurde dabei beispielsweise als Target des E7-Onkoproteins des humanen onkogenen Papillomavirus Typ 16 ⁽⁹⁴⁾, des Ras-Proteins ⁽⁹⁵⁾ oder auch onkogener Tyrosinkinasen ⁽⁹²⁾ identifiziert.

Das glykolytische Protein gilt ferner aufgrund seiner Überexpression bei vielen Krebsarten als ein organunspezifischer Tumormarker ⁽⁹⁶⁾. Neben dem verstärkten Vorkommen im Gewebe konnte PKM2 auch im Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen ⁽⁸⁸⁾ sowie im Stuhl von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen ⁽⁹⁷⁾ in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann PKM2 als klinischer Parameter zur Überwachung des Erfolgs oder Rückfalls einer Therapie eingesetzt werden ⁽⁹⁷⁾.

Hitzeschockprotein 90 beta (HSP90β)

HSPs zählen zu den höchst konserviertesten Proteinen, die ubiquitär vom Bakterium bis zum Menschen vorkommen ⁽⁹⁸⁾. HSP90β gehört zur HSP90-Familie, die noch drei weitere Mitglieder in unterschiedlichen Zellkompartimenten umfasst ⁽⁹⁹⁾. Als Chaperon ist HSP90 an der post-translationalen Reifung (Aktivierung) und Stabilisierung von über 100 Substratproteinen beteiligt, zu denen u. a. Transkriptionsfaktoren, nukleare Hormonrezeptoren und Proteinkinasen zählen¹ ⁽¹⁰⁰⁾. HSP90 interagiert dabei in einem dynamischen, ATP-abhängigen Zyklus unter dem Einfluss von Co-Chaperonen mit seinen Substratproteinen ⁽¹⁰¹⁾. Zusätzlich beeinflussen posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung ⁽¹⁰²⁾ oder Acetylierung ^(103,104), die Interaktion mit Substratproteinen und die ATP-Bindung. Unter Stressbedingungen, wie beispielsweise Hitzeschock, ist die Chaperon-Funktion vor allem für das Überleben von Zellen von Bedeutung, da sie die Aggregation entfalteter Proteine verhindert ⁽¹⁰⁵⁾, die andernfalls in toxischen Stresssignalen münden würde. In Tumorzellen ist diese Aktivität hingegen kritisch. Viele Substratproteine des HSP90, wie beispielsweise Raf-1, p53, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor sowie Androgen- und Östrogenrezeptoren, sind in wachstumsregulatorische Signalwege involviert und werden häufig während der Karzinogenese fehlreguliert ^(99,100). Die HSP90-Chaperon Maschinerie schützt diese Proteine vor Missfaltung und dem Abbau durch das Proteasom und ermöglicht damit die Transformation und das Überleben von Tumorzellen ⁽¹⁰⁰⁾. HSP90 wird aufgrund dessen von verschiedenen Tumoren in erhöhter Menge exprimiert ⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁹⁾.

Bei der Suche und Entwicklung neuer Tumormedikamente ist HSP90 als Zielprotein längst in den Blickpunkt gerückt. Die Hemmung des HSP90 wird von einer

¹ Eine aktuelle Liste der mit HSP90 interagierenden Co-Chaperone und Substratproteine ist auf der Webseite des Labors von D. Picard, Universität von Genf, Schweiz (<http://www.picard.ch/>) zu finden.

Herunterregulation seiner Substratproteine und einer verminderten Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden begleitet, die auf zellulärer Ebene u. a. mit einem verminderten Tumorwachstum, verminderter Tumovaskularisierung sowie einer erhöhten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika einhergeht^(110,111). Einige Inhibitoren, darunter beispielsweise 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin, wurden bereits in klinischen Studien getestet und lieferten erfolversprechende Ergebnisse in Kombination mit anderen Therapien bei Brustkrebs, multiplen Myelomen und akuten myeloischen Leukämien⁽¹¹²⁾. Neben natürlichen und synthetischen Inhibitoren wurden auch Vertreter verschiedener Substanzklassen nicht-nutritiver Nahrungskomponenten, wie beispielsweise Quercetin⁽¹¹³⁾, Genistein⁽¹¹⁴⁾ und Epigallocatechin-3-Gallat⁽¹¹⁵⁾ als potenzielle HSP90-Inhibitoren beschrieben.

Alpha-Defensine

Defensine sind kleine (29-42 Aminosäuren, 2-6 kDa) kationische Peptide, die eine zentrale Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielen. Anhand der Position der Disulfidbrücken und der Peptidsegmente zwischen den Cystein-Resten wird zwischen alpha- und beta-Defensinen unterschieden. Alpha-Defensine werden von intestinalen Paneth-Zellen und intermediären Zellen des Dünndarms (Humane Defensine 5 und 6) sowie von neutrophilen Granulozyten (Humane neutrophile Peptide 1-4) produziert und in sekretorischen Granula gespeichert^(116,117). Neben ihrer lytischen und chemotaktischen Wirkung in der Immunabwehr wurden alpha-Defensine ferner mit der Entwicklung verschiedener Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Die humanen neutrophilen Peptide (HNP) 1-3 wurden beispielsweise in erhöhter Konzentration in epithelialen Tumoren des Kolons^(118,119), der Blase⁽¹²⁰⁾ oder der Niere⁽¹²¹⁾ gefunden.

Unklar ist bislang, welche Rolle alpha-Defensine in der Mikroumgebung von Tumoren spielen. In Abhängigkeit der Defensin-Konzentration wurden zum einen Tumorpromovierende Effekte und zum anderen Tumor-inhibierende Eigenschaften beschrieben. Niedrige HNP1-3 Konzentrationen sind beispielsweise mit einer Proliferationssteigerung⁽¹²¹⁾ oder einer Aktivitätshemmung von Immunzellen⁽¹²²⁾ assoziiert, während hohe Konzentrationen (> 25 µg/ml) zytotoxische⁽¹²³⁾ und proapoptotische Wirkungen⁽¹²⁴⁾ haben.

Neben dem malignen Gewebe wiesen auch Blut-^(118,119) und Stuhlproben^(124,125) von Kolorektalkrebspatienten erhöhte Konzentrationen an HNP1-3 auf. Für eine Nutzung als Tumormarker sind diese alpha-Defensine jedoch relativ unspezifisch, da ihre Konzentration sowohl bei anderen Tumorerkrankungen^(120,121) als auch bei Infektionen bzw. Entzündungen^(126,127) ansteigt. Das humane Defensin 6 (HD6) gilt hingegen aufgrund seiner hohen Expression in Kolontumoren im Vergleich zu anderen Krebsarten

als ein spezifischerer Marker für Kolonkrebs ⁽¹²⁸⁾. Eine verminderte Expression von enterischen alpha-Defensinen, die zu einem Defekt in der mukosalen Barrierefunktion führt, wird ferner als Ursache bei Morbus Crohn des Dünndarms angenommen ⁽¹²⁹⁾. Mehrere nachgewiesene Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Tcf-4 in den für HD5- bzw. HD6-kodierenden Genen (*DEFA5* bzw. *DEFA6*) ^(31,130) lassen u. a. auf eine Regulation der Expression über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg schließen. Die konstitutive Aktivierung des Signalwegs spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung kolorektaler Adenome und Karzinome und ist eines der frühesten ursächlichen Ereignisse in der Kolonkarzinogenese ⁽¹³¹⁾. Ob die erhöhte Expression von HD6 dabei die Transformation gesunder Zellen fördert oder eine Abwehrstrategie des Organismus gegenüber entarteten Zellen darstellt, ist bislang unbekannt.

Antioxidative Enzyme

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase und Abwehr von oxidativen Schädigungen verfügen aerob-lebende Organismen über ein komplexes Schutzsystem, welches neben Reparaturmechanismen vor allem eine Vielzahl antioxidativ-wirksamer Verbindungen und Enzyme umfasst. Zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen zählen die Superoxiddismutasen (SODs), die Katalase (CAT) sowie die Glutathionperoxidasen ⁽¹³²⁾. SODs katalysieren als Dimer oder Tetramer die Disproportionierung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff. Die Neutralisation der Superoxidanionen erfolgt dabei durch einen sukzessiven Wechsel zwischen Oxidation und Reduktion des Metallions im aktiven Zentrum der Enzyme. Drei humane SOD-Isoformen wurden bislang identifiziert, die im Zytosol (CuZnSOD bzw. SOD1), im Mitochondrium (MnSOD bzw. SOD2) sowie im Interstitium und den extrazellulären Flüssigkeiten (SOD3) lokalisiert sind ⁽¹³³⁾.

Die mitochondriale SOD ist dabei primär für den Abbau von Superoxidanionen verantwortlich, die während des Elektronentransportes in der Atmungskette, der Hauptquelle freier Radikale, generiert werden ⁽¹³³⁾. Das Gen der SOD2 ist auf Chromosom 6 (6q25.3) lokalisiert und wird u. a. durch Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- κ B, AP-2 und Sp1 (Specificity protein 1) reguliert ⁽¹³⁴⁾. Im Gegensatz zur SOD1 und SOD3 ist die Expression der SOD2 für Säugerzellen von essentieller Bedeutung. Ein Knock-out der mitochondrialen SOD führte in Mäusen postnatal zum Tod und ist mit neurodegenerativen sowie kardiologischen Veränderungen assoziiert ⁽¹³⁵⁾. Darüber hinaus zeigte eine weitere Studie, dass bereits eine lebenslang verminderte SOD2-Aktivität in heterozygoten SOD2^{+/-}-Mäusen mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und damit in Zusammenhang stehenden Erkrankungen, wie Tumoren, verbunden ist ⁽¹³⁶⁾. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurden in vielen humanen

Tumorentitäten geringere Expressionslevel des antioxidativen Enzyms festgestellt ⁽¹³⁷⁾. Die dabei vermutete Tumorsuppressor-Funktion des Proteins wurde ferner durch wachstumshemmende Eigenschaften SOD2-überexprimierender Zellen *in vitro* und *in vivo* belegt ^(138,139). Diese Rolle ist jedoch umstritten, da insbesondere Tumore des Gastrointestinaltraktes, des zentralen Nervensystems und Mesotheliome erhöhte SOD2-Expressionslevel im Vergleich zu normalen Geweben aufweisen, die im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose ⁽¹⁴⁰⁾ sowie einem invasiven und migratorischen Phänotyp stehen ⁽¹⁴¹⁾. SOD2 ist hierbei u. a. für eine H₂O₂-abhängige Induktion gewebemodulierender Matrix-Metalloproteinasen verantwortlich, die Tumorzellen zur Metastasenbildung befähigt ⁽¹⁴²⁾.

Ähnlich wie bei SOD2 wurde auch eine dysregulierte Expression bzw. Aktivität der CAT in humanen Tumoren gefunden ⁽¹⁴³⁾. Das tetramere Häm-Enzym, welches aus vier identischen Untereinheiten (60 kDa) besteht, beseitigt in einer Disproportionsreaktion das anfallende H₂O₂ unter der Bildung von Wasser und molekularem Sauerstoff ⁽¹³³⁾. Zudem katalysiert es die Entgiftung von Peroxiden in Anwesenheit von Wasserstoffdonatoren (z. B. Methanol, Ethanol, Formaldehyd) ⁽¹³³⁾ und kann bei Überexpression durch die Hochregulation des Arylhydrocarbon-Rezeptors zu einer beschleunigten Detoxifikation von aromatischen Kohlenwasserstoffen beitragen ⁽¹⁴⁴⁾.

Die Induktion der CAT bzw. antioxidativer Enzymsysteme gilt allgemein als ein schützender Mechanismus in der Chemoprävention maligner Kolontumore. Viele mit der Nahrung aufgenommene Pflanzenstoffe ^(145,146) sowie CAT-produzierende Bakterien ⁽¹⁴⁷⁾ führten *in vivo* zu einer Suppression oder Reduktion des Tumorwachstums, begleitet von einer Verbesserung des antioxidativen Status. Eine gezielte Verteilung von CAT-Derivaten im Gewebe bewirkte darüber hinaus eine Hemmung der Tumormetastasierung, bei der H₂O₂ offensichtlich eine große Rolle spielt ⁽¹⁴⁸⁾. Passend dazu wurden niedrigere Aktivitäten der CAT in den Geweben oder im Plasma von Patienten mit malignen Erkrankungen des Kolons ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾, des Pankreas ⁽¹³⁷⁾ und der Mundhöhle ⁽¹⁵²⁾ im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen gemessen.

Glutathion S-Transferasen (GSTs)

GSTs sind Enzyme einer Multi-Genfamilie, die primär an der Entgiftung von exogenen toxischen Substanzen und reaktiven endogenen Metaboliten beteiligt sind, aber substanzabhängig in einigen Fällen auch eine Bioaktivierung von Fremdstoffen verursachen. Sie katalysieren den nukleophilen Angriff des Tripeptids Glutathion (γ -Glutaminsäure, Cystein, Glycin) auf ein elektrophiles Substrat und damit den ersten Schritt in der Synthese von Mercaptursäuren ^(153,154). Diese werden sowohl auf renalem als auch biliärem Weg aus dem Organismus eliminiert ^(155,156). In Abhängigkeit ihrer

Struktur, der zellulären Lokalisation und den enzymatischen Eigenschaften werden zytosolische, mitochondriale und mikrosomale Formen der GSTs unterschieden. Die zytosolischen GSTs bilden dabei als lösliche Dimere mit sieben Klassen (alpha, mu, pi, sigma, theta, omega und zeta) die größte Familie, die insgesamt 16 Isoformen umfasst. Bei den mitochondrialen GSTs ist hingegen nur eine Form bekannt (kappa). Die humanen membrangebundenen GSTs (MAPEG) lassen sich drei Untergruppen zuordnen. Sie sind überwiegend in die Eicosanoid-Synthese involviert ^(153,154).

GSTs sind polymorphe Enzyme, die ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen ⁽¹⁵³⁾. Im Hinblick auf die Prävention von malignen Erkrankungen des Kolons gilt eine Induktion des GST-Systems durch Interventionen in gesunden Zellen allgemein als schützend. Als Hauptisoform der Kolonozyten und einziger Vertreter der Pi-Klasse besitzt GSTP1 eine besondere Bedeutung, da es u. a. in der Lage ist, Benzo(a)pyrendiolepoxid und andere Diolepoxide von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zu entgiften ^(157,158). Diese Substanzen gelangen beispielsweise durch den Verzehr von zu stark erhitzten, gegrillten oder geräucherten Lebensmitteln – insbesondere Fleisch und Fisch – in den Dickdarm und können infolge der metabolischen Aktivierung zu einer DNA-Adduktbildung führen, welche bekanntermaßen zur Initiation der Tumorentstehung beitragen kann ⁽¹⁵⁹⁾.

In Kolontumoren und Tumorzelllinien wurden mehrheitlich erhöhte Gehalte des Entgiftungsenzyms nachgewiesen, die sowohl mit einer gesteigerten GST-Gesamtaktivität im malignen Gewebe als auch im Plasma von Tumorpatienten einhergingen ^(157,160). Die Überexpression der GSTP1 tritt dabei vermutlich als Folge eines mutierten *KRAS*-Gens auf und stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für Tumore und präneoplastische Läsionen dar ^(161,162). GSTP1 schützt die Zellen durch die Reduktion Lipidperoxid-induzierter DNA-Schäden und die Regulation zellulärer Funktionen, wie z. B. der gezielten Aktivierung bzw. Inhibierung von MAP-Kinasen, vor Apoptose ^(163,164). Darüber hinaus stellt der Grad der Expression des Entgiftungsenzyms einen wichtigen Resistenzfaktor gegen verschiedene Chemotherapeutika dar ⁽¹⁶⁵⁾.

Die GSTM2 ist eine weitere im Kolonepithel zu findende GST-Isoform, die allerdings in geringerer Menge im Vergleich zur GSTP1 exprimiert wird ⁽¹⁵⁷⁾. Das Isoenzym besitzt eine hohe Affinität zu *o*-Chinonen (z. B. Aminochrom), welche Oxidationsprodukte der Katecholamine sind und über die Bildung von DNA-Addukten möglicherweise die Entwicklung von Tumoren und neurodegenerativen Erkrankungen begünstigen ^(166,167). Ein Zusammenhang zwischen dieser Stoffgruppe und dem Risiko, an Dickdarmkrebs zu erkranken, könnte vermutlich durch das Ausmaß an Bewegung gegeben sein. Die Konzentration von Katecholaminen im Blut wird u. a. durch körperliche Aktivität beeinflusst, die nachweislich zu einer Reduktion der Ausschüttung führt ⁽¹⁶⁸⁾.

Eine Induktion der *GSTM2* und *GSTP1* innerhalb des GST-Systems, wie sie beispielsweise durch Butyrat in primären epithelialen Kolonzellen und von Kolontumoren abstammenden Zelllinien bereits gezeigt wurde ^(157,169), könnte möglicherweise die Inzidenz kolorektaler Läsionen reduzieren.

Im Gegensatz zur *GSTP1* wurden in Kolontumoren geringere Gehalte der *GSTM2* beobachtet, deren Bedeutung bislang spekulativ ist ^(157,170). Verschiedene Autoren zeigten hierbei, dass neben genetischen Einflüssen insbesondere epigenetische Mechanismen eine Rolle bei der Regulation der *GSTM2*-Genexpression spielen ^(171,172).

1.2 Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms

Aufgrund der hohen Erkrankungs- und Sterblichkeitsraten weltweit spielen präventive Maßnahmen und Interventionen bei der Bekämpfung von Kolonkrebs eine immer größere Rolle. Ein günstiger Aspekt für die Anwendung effektiver Präventionsstrategien ist dabei die Entwicklung der Tumore, die in den meisten Fällen von adenomatösen Polypen ausgeht und 10-15 Jahre umfasst ⁽¹⁷³⁾. Neben den bisweilen wenig in Anspruch genommenen Screening-Maßnahmen (Koloskopie, Hämokult-Test) ⁽¹⁷⁴⁾, repräsentiert das Gebiet der Chemoprävention einen ergänzenden Ansatz, um die Inzidenz und Mortalität von kolorektalen Tumoren zu reduzieren. Der Begriff Chemoprävention beschreibt den Gebrauch von pharmakologisch oder natürlich wirksamen Substanzen, die die Entstehung von invasiven Tumoren hemmen, indem sie die initiierten DNA-Schäden verhindern oder die Progression prä-maligner Zellen mit bereits manifestierten Schäden hemmen oder umkehren ⁽¹⁷⁵⁾. Grundlegende Mechanismen, welche die Basis für die Anwendung der meisten chemopräventiven Agenzien sind, umfassen die Umkehr einer abnormalen Differenzierung bzw. Induktion der Differenzierung, Unterdrückung der Zellreplikation oder Induktion eines apoptotischen Stadiums (Abb. 2). Substanzen mit diesen Eigenschaften wurden von Wattenberg als sogenannte „Suppressing Agents“ deklariert und verhindern die neoplastische Entwicklung (Promotion und Progression) bereits entarteter Zellen (Sekundärprävention) ⁽¹⁷⁶⁾. Sogenannte „Blocking Agents“ intervenieren hingegen in früheren Stadien der Karzinogenese mit dem Ziel, Mutationen vorzubeugen und damit die Tumor-Initiation zu hemmen (Primärprävention) ^(176,177). Sie sind vor allem über die Inhibierung der metabolischen Aktivierung potenzieller Promutagene bzw. -kanzerogene, die Induktion von Entgiftungsenzymen oder das Abfangen reaktiver krebserzeugender Verbindungen wirksam, bevor diese mit den kritischen Zielmolekülen der Zelle, wie der DNA, reagieren können. Die dritte Ebene der Prävention beinhaltet Strategien, die die Tumorinvasion und -metastasierung hemmen sowie Krankheitsrückfälle verhindern sollen (Tertiärprävention). Sie ist allerdings nicht mehr in der Definition der Chemoprävention inbegriffen ⁽¹⁷⁷⁾.

Große Aufmerksamkeit als chemopräventiv wirksame Substanzen erlangten nicht-steroidale anti-inflammatorische Drogen (NSAIDs), wie z. B. Aspirin oder Sulindac, die die Aktivität von Cyclooxygenasen hemmen. Trotz nachgewiesener Wirkung ist die Anwendung bei sporadischem Kolonkrebs wegen der gastrointestinalen sowie renalen Toxizität, die hauptsächlich durch die Hemmung der COX-1 verursacht wird, limitiert ⁽¹⁷³⁾. Selektive COX-2 Inhibitoren, wie z. B. Celecoxib oder Rofecoxib, zeigten sich in Studien ebenfalls als effektive Agenzien und reduzierten die Anzahl von Polypen bei Kolonkrebsrisiko- und FAP-Patienten ^(173,178). Die Langzeiteinnahme ist allerdings für Individuen mit vorangegangener atherosklerotischer Herzkrankheit mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre und thrombotische Erkrankungen verbunden ⁽¹⁷⁹⁾.

Neben NSAIDs und selektiven COX-2 Inhibitoren zeigten auch andere pharmakologisch wirksame Substanzen sowie Nahrungsmittelinhaltsstoffe chemopräventive Aktivität *in vitro* und *in vivo* ⁽¹⁷³⁾. Laut WCRF gelten Knoblauch, Milch und Kalzium als möglicherweise schützend ⁽⁴⁾. Der Verzehr ballaststoffhaltiger Lebensmittel zählt bereits zu den protektiven Lebensgewohnheiten ⁽²⁾.

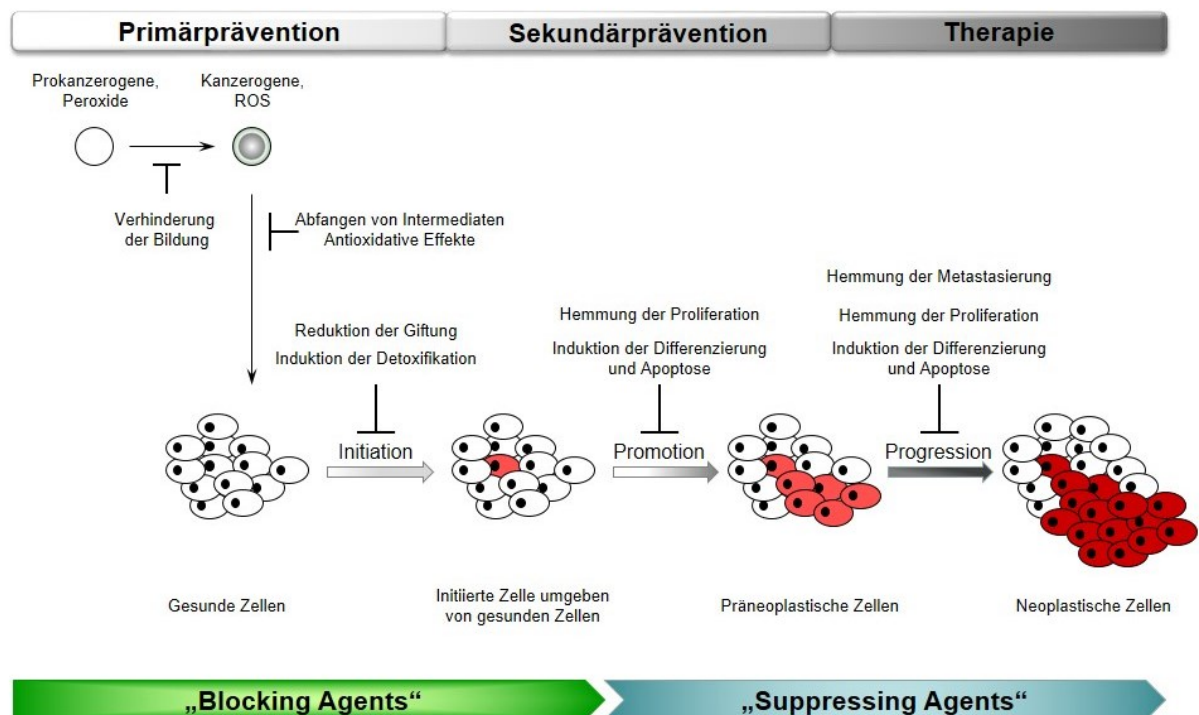


Abb. 2: Die verschiedenen Phasen der Krebs-Chemoprävention und mit ihr assoziierte Mechanismen. ROS, reaktive Sauerstoffspezies (modifiziert nach ⁽¹⁸⁰⁾).

1.2.1 Ballaststoffe und ihre intestinalen Fermentationsprodukte

Die potenzielle Bedeutung einer ballaststoffreichen Ernährungsweise im Hinblick auf die Vermeidung bestimmter Darmerkrankungen, darunter Kolorektalkrebs, wurde von Burkitt bereits Anfang der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts erkannt. Er führte dabei die niedrigen Inzidenzraten in ländlichen Bevölkerungsgruppen Afrikas im Vergleich zu denen europäischer Einwohner auf die ballaststoffreiche Ernährung zurück, die u. a. in höheren Stuhlgewichten und kürzeren Stuhl-Transitzeiten resultierte und damit vermutlich die Exposition des Darmepithels mit Karzinogenen verringert hat ^(181,182).

Der Begriff „Ballaststoffe“ umfasst eine Vielzahl verschiedener Substanzen, zu denen Nicht-Stärke-Polysaccharide (z. B. Zellulose, Arabinoxylane, Inulin), resistente Oligosaccharide, Lignin und assoziierte pflanzliche Verbindungen wie Wachse oder Tannine gehören ⁽¹⁸³⁾. Einer aktuellen und allgemein akzeptierten Definition des Codex-Komitees für Ernährung und diätetische Lebensmittel zufolge sind Ballaststoffe Kohlenhydrat-Polymere mit zehn oder mehr Monomeren, die durch die humanen, endogenen Verdauungsenzyme des Dünndarms nicht hydrolysiert werden. Laut Definition zählen dazu Kohlenhydrat-Polymere, die natürlicherweise in konsumierten Lebensmitteln vorkommen; Kohlenhydrat-Polymere, die auf physikalischem, enzymatischem oder chemischem Weg aus Lebensmittel-Rohstoffen gewonnen werden und wissenschaftlich nachweisbare gesundheitsfördernde Effekte haben; und synthetische Kohlenhydrat-Polymere, die ebenfalls wissenschaftlich belegte und anerkannte Effekte auf die Gesundheit ausüben ⁽¹⁸⁴⁾.

Ballaststoffe werden ferner in lösliche und unlösliche Ballaststoffe eingeteilt ⁽¹⁸⁵⁾. Lösliche Ballaststoffe, wie z. B. Pektine oder Pflanzengummis, verzögern durch ihre viskösen Eigenschaften die Magenentleerung und die Aufnahme von Glukose, welche als Konsequenz eine Reduktion des postprandialen Blutzuckerspiegels und der Insulinämie zur Folge hat. Im Dickdarm unterliegen sie weitestgehend einer Hydrolyse und Fermentation durch die lokale Mikroflora. In Abhängigkeit der Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora sowie der Art und Menge der aufgenommenen Ballaststoffe entstehen bei diesem Prozess hauptsächlich Gase (O_2 , CH_4 , H_2) und kurzkettige Fettsäuren (*engl.* short chain fatty acids, SCFAs), die indirekt lokale Effekte vermitteln oder die systemische Zirkulation erreichen. Unlösliche Ballaststoffe, wie beispielsweise Zellulose, werden hingegen nur in geringem Umfang fermentiert und weitgehend unverdaut ausgeschieden. Ihre Bedeutung liegt in der Erhöhung der Stuhlmasse („Füllstoff“), die eine erhöhte Darmmotilität und eine verkürzte Transitzeit des Stuhls zur Folge hat ⁽¹⁸⁶⁾.

SCFAs entstehen vornehmlich im Zäkum und im proximalen Kolon durch die Aktivität saccharolytischer Bakterien. Ihre Gesamtmenge beträgt im proximalen Kolon zwischen

70-140 mM und fällt nach distal auf 20-70 mM ab. Die bedeutendsten und quantitativ am häufigsten vorkommenden SCFAs sind Azetat, Propionat und Butyrat, welche in einem molaren Verhältnis von 60:20:20 gebildet werden ^(187,188). Da SCFA schwache Säuren sind ($pK_a \approx 4,8$), liegen mehr als 90 % von ihnen in der anionischen, unprotonierten Form im Dickdarmlumen vor ⁽⁶⁾. Die Aufnahme in die Kolonozyten (> 90 %) erfolgt durch verschiedene Mechanismen, welche eine einfache Diffusion (undissoziierte SCFA), einen Anionenaustausch (SCFA/HCO₃⁻) und einen aktiven Transport durch SCFA-Transporter umfassen ^(6,188). Die Bedeutung von SCFA für die intestinale Homöostase liegt vor allem in der Bereitstellung von Energie für die Kolonozyten und der Vorbeugung einer Atrophie des Gewebes. Insbesondere Butyrat wird dabei vorzugsweise auch in Anwesenheit anderer Energiequellen, wie beispielsweise Glukose und Glutamin, metabolisiert und zu 70-90 % über die β -Oxidation abgebaut. Als Butyratbildner wurden bislang Bakterienspezies der Gattungen *Eubacterium*, *Roseburia*, *Clostridium* und *Faecalibacterium* identifiziert ⁽¹⁸⁹⁻¹⁹¹⁾. Diese synthetisieren Butyrat vornehmlich durch Metabolisierung von extrazellulärem Azetat und Laktat, während ein geringerer Anteil der Bakterien direkt in der Lage ist, Butyrat über den Abbau von Kohlenhydraten zu bilden ^(191,192).

Die Entstehung von SCFA hat darüber hinaus einen Abfall des intraluminalen pH-Wertes zur Folge, der indirekt die Zusammensetzung der Mikroflora beeinflusst ⁽¹⁸⁸⁾. Dabei wird außerdem der Gehalt an sekundären Gallensäuren reduziert, welche mit einem tumorpromovierenden Potenzial assoziiert sind ⁽¹⁹³⁾. Hinsichtlich der Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms hat Butyrat bedingt durch eine Vielzahl protektiver Effekte *in vitro* und *in vivo* die meiste Aufmerksamkeit unter den SCFAs erlangt. Während die C₄-Fettsäure die Proliferation in normalen Kolonzellen fördert, zeigt sie hingegen *in vitro* eine wachstumshemmende, differenzierungs- und/oder Apoptose-induzierende Wirkung auf transformierte Zellen. Diese unterschiedlichen Effekte wurde als Butyrat-Paradoxon bekannt und sind scheinbar von der Verfügbarkeit anderer Energiequellen abhängig ⁽¹⁹⁴⁾. Als ein möglicher Mechanismus für die an Adenom- und Krebszellen beobachteten Effekte gilt die Hemmung von Histon-Deacetylasen (HDACs). Diese induziert eine Hyperacetylierung der Histone und bedingt damit eine Veränderung der Transkription von beispielsweise wachstumsregulatorischen Genen. Neben der Modulation des Zellwachstums beeinflusst Butyrat aber auch Mechanismen der Primärprävention des Kolonkarzinoms, zu denen die Induktion von GSTs und antioxidativen Enzymsystemen zählt. Ferner sind antiinflammatorische Effekte ^(195,196) und eine Stimulation der Mucin-Synthese ⁽¹⁹⁷⁾, welche die mechanische Schutzbarriere des Kolonepithels stärkt, beschrieben.

1.2.2 Inulin-artige Fruktane

Inulin-artige Fruktane werden aufgrund ihrer Unverdaulichkeit und Fermentation im Kolon zur Gruppe der Ballaststoffe gezählt. Chemisch betrachtet stellen sie eine Mischung aus Glukopyranosyl-(Fruktofuranosyl)_n-Fruktose ($G_{py}F_n$) und Fruktopyranosyl-(Fruktofuranosyl)_n-Fruktose ($F_{py}F_n$) mit unterschiedlichen Polymerisationsgraden dar. Den Hauptbestandteil der linearen Oligo- und Polymere bildet demnach Fruktose, welche über β -(2–1)-glykosidische Bindungen verknüpft ist. Am häufigsten sind Inulin-artige Fruktane in Weizen, Zwiebeln, Bananen, Knoblauch und Lauch zu finden. Die Chicorée-Wurzel, die ebenfalls eine gute Inulin-Quelle darstellt, wird meist für die industrielle Extraktion verwendet. Neben nativem Inulin, welches Kettenlängen von 2-60 (im Durchschnitt 12) Fruktose-Molekülen umfasst, gehören zur Gruppe der Inulin-artigen Fruktane auch hochmolekulares bzw. langkettiges Inulin ($G_{py}F_n$, $n=10-60$, im Durchschnitt $n=25$), welches durch physikalische Separation von Oligomeren mit Kettenlängen von weniger als 10 Fruktose-Molekülen gewonnen wird, Oligofruktose (Mix aus $G_{py}F_n$ und $F_{py}F_n$ -Molekülen, $n=2-7$, im Durchschnitt $n=4$) und Synergy1[®]. Letzteres wird durch die Mischung von niedrig-molekularer Oligofruktose und langkettigem Inulin erzeugt und gleichermaßen auch als Oligofruktose-angereichertes Inulin bezeichnet⁽¹⁹⁸⁾.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Ballaststoffen werden Inulin-artige Fruktane selektiv fermentiert und verursachen somit signifikante Veränderungen in der Zusammensetzung und/oder Aktivität der gastrointestinalen Mikroflora mit positiven Auswirkungen auf die Darmgesundheit und das allgemeine Wohlbefinden des Wirts^(199,200). Nahrungsmittelinhaltsstoffe mit dieser Eigenschaft, die zudem nachweislich durch die intestinale Mikroflora fermentiert werden sowie Magensäure-resistent und nicht zugänglich für endogene Verdauungsenzyme sind, gelten als Präbiotika. Meist wird mit der Definition die Zunahme der Anzahl und/oder Aktivität potenziell gesundheitsfördernder Bakterien, wie Laktobazillen und Bifidobakterien assoziiert, die abhängig vom Polymerisierungsgrad der Fruktane ist^(200,201). Unter den positiven Effekten, die diese Bakterienarten haben, ist vor allem die Bildung von Azetat und Laktat als metabolische Endprodukte hervorzuheben. Zusammen mit anderen SCFAs, deren Konzentration durch die gute Fermentierbarkeit Inulin-artiger Fruktane ebenfalls erhöht ist, führen diese zu einer Senkung des intestinalen pH-Wertes und inhibieren so das Wachstum potenziell schädlicher Bakterien, wie z. B. *Clostridium spp.* oder coliforme Keime⁽²⁰²⁾. Insbesondere Butyrat wird bei der Fermentation von Inulin in 4-fach höherer Menge gebildet im Vergleich zu anderen Ballaststoffquellen⁽²⁰³⁾.

Neben den präbiotischen bzw. bifidogenen Eigenschaften wurden weitere gesundheitsfördernde Effekte Inulin-artiger Fruktane beschrieben, die u. a. die Erhöhung der Mineralstoffabsorption und gastrointestinaler Abwehrfunktionen sowie die

Beeinflussung der Lipid-Homöostase beinhalten ^(198,201,204). In-vitro- und In-vivo-Studien haben ferner gezeigt, dass mit der Aufnahme ein vermindertes Risiko für verschiedene Erkrankungen, darunter Kolorektalkrebs, assoziiert sein kann. So wiesen mit Azoxymethan- oder 1,2-Dimethylhydrazin-behandelte Ratten nach einer Intervention mit Synergy1[®] bzw. Oligofruktose weniger kolorektale Tumore bzw. erhöhte Apoptoseraten in den Darmkrypten auf als Tiere der jeweiligen Kontrollgruppe ^(205,206). Die kontinuierliche Bildung von Butyrat scheint dabei ein entscheidender Faktor zu sein ⁽²⁰⁷⁾. Versuche mit humanen Krebszelllinien identifizierten darüber hinaus potenzielle chemopräventive Mechanismen, wie z. B. die Hemmung der Proliferation, die Induktion apoptotischer Signalwege, die Reduktion der Faezeswasser-Genotoxizität oder die Modulation von Genen der Biotransformation ⁽²⁰⁸⁻²¹⁰⁾. Klinische Daten aus Humanstudien sind hingegen limitiert und geben bislang keine überzeugenden Hinweise für eine Reduktion des Kolonkrebsrisikos ⁽²¹¹⁾. Erfolgversprechendere Ansätze diesbezüglich stellen beispielsweise Kombinationen aus Inulin-artigen Fruktanen und probiotischen Bakterienstämmen oder selektiven COX-2 Hemmern dar. Als sogenanntes Synbiotikum führte Synergy1[®] zusammen mit zwei Bakterienarten (*Lactobacillus rhamnosus* GG und *Bifidobacterium lactis* Bb12) zu einer Reduktion stuhl- und gewebespezifischer Risikofaktoren in Kolonkrebs gefährdeten Patienten ⁽²¹²⁾. Positive Effekte konnten auch bei der Verabreichung eines Fruktooligosaccharids in Kombination mit Celecoxib erzielt werden, die bislang nur im Tierversuch zu einer verminderten Inzidenz aberranter kryptischer Foci im Kolon führten ⁽²¹³⁾.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Expression von *OPN*, *COX-2*, *HSP90 β* , *PKM2*, *DEFA1-3*, *DEFA6*, *CAT*, *SOD2*, *GSTP1* und *GSTM2* zwischen den verschiedenen Transformationsgraden des primären Kolongewebes (Normal, Adenom, Tumor)? Welche Gene besitzen dabei das Potenzial, vor allem Patienten in frühen Stadien der Kolonkarzinogenese eindeutig zu identifizieren? Welchen Einfluss haben das Alter, das Geschlecht und das Tumorstadium sowie der Differenzierungsgrad der Tumore (Tumorgrading) auf die Expression der verschiedenen Gene (**Publikation I, II, III, IV; weitere Ergebnisse**)?
- Gibt es Einflüsse von Darmfermentationsprodukten wie Butyrat auf die mRNA-Expression dieser Gene und wie unterscheiden sich diese zwischen Normal-,

Adenom- und Tumorgewebe? Liegt möglicherweise eine differenzielle Modulation der Gene auf transkriptionaler Ebene vor (**Publikationen II, III, IV; weitere Ergebnisse**)?

- Erzielt ein *in vitro* fermentiertes komplexes Kohlenhydrat (Inulin angereichert mit Oligofruktose; Synergy1®), welches ein realistischeres Abbild der physiologischen Verhältnisse ermöglicht, vergleichbare Effekte im Hinblick auf die Modulation der oben genannten Gene wie die Einzelsubstanz Butyrat (**weitere Ergebnisse**)?
- Wie gut stimmen die ermittelten Veränderungen der Zielgene auf Genexpressionsebene mit denen der korrespondierenden Proteine bei Verwendung von Gewebe des gleichen Spenders überein? Kann das mRNA-Expressionsniveau eines Gens als alleiniger Parameter herangezogen werden, um Veränderungen des jeweiligen Proteins vorherzusagen (**Publikationen II, III, IV; weitere Ergebnisse**)?
- Welche Konsequenzen ergeben sich nach einer Behandlung der verschieden transformierten Kolongewebe mit Butyrat für die Aktivitäten von Enzymen wie CAT, SOD2 und GSTs sowie für die zelluläre Integrität? Kann die Exposition des Darmepithels mit Fermentationsprodukten wie Butyrat zu einer Reduktion induzierter DNA-Schäden beitragen (**Publikation IV; weitere Ergebnisse**)?

2 Publikationen²

- 2.1 Publikation I: Defensin alpha 6 (DEFA 6) overexpression threshold of over 60 fold can distinguish between adenoma and fully blown colon carcinoma in individual patients.** Mariya Y Radeva, [Franziska Jahns](#), Anne Wilhelm, Michael Gleis, Utz Settmacher, Karl Otto Greulich, Henning Mothes. *BMC Cancer*, 2010; 10:588-93.

Die humanen neutrophilen (HNP1-3) und enterischen (HD6) alpha-Defensine sind Teil einer Gruppe kleiner kationischer Peptide, die vielfältige Aufgaben in der angeborenen und adaptiven Immunantwort wahrnehmen. Neben ihrer zentralen Funktion als „körpereigene Antibiotika“ wurden alpha-Defensine aufgrund ihrer erhöhten Expression in malignen Geweben sowie Seren von Krebspatienten auch mit der Tumorgenese verschiedener Krebserkrankungen, darunter Kolorektalkrebs, in Verbindung gebracht. Die vorliegende Studie hat erstmalig die Genexpressionsmuster von HNP1-3 (Gen: *DEFA1-3*) und HD6 (Gen: *DEFA6*) über die gesamte Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms mittels quantitativer Real-time PCR untersucht.

Während für *DEFA1-3* ein kontinuierlicher Anstieg im Verlauf der Tumorprogression beobachtet werden konnte (tumornahes Kolongewebe: 2,8-fach, Adenom: 4-fach, Tumor: 6,4-fach), zeichnete sich für *DEFA6* bereits im prämaligen Adenomstadium ein explosionsartiger Anstieg der Transkriptmenge ab. Die Mehrheit der untersuchten Adenomproben (13/18) zeigte dabei eine um mehr als 60-fach erhöhte (median 100-fach) Transkriptmenge des enterischen Peptids. Ein derartiger Anstieg ließ sich lediglich bei 3 von 17 Karzinomen feststellen. Die analysierten Tumore wiesen im Allgemeinen zwar eine erhöhte *DEFA6* mRNA-Expression auf, die im Vergleich zu Adenomen jedoch rückläufig war (medianer Fold Change Tumor vs. Normal: 5-fach). *DEFA6* könnte folglich als ein potenzieller Marker zur Identifizierung vorzugsweise prämaligener Tumorstadien Anwendung finden.

Eigenanteil:

- Anteilige Aufarbeitung der Kolongewebeproben, RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse mittels Real-time PCR
- Beteiligung an der Manuskripterstellung

² Weitere Publikationen, die nicht in den engeren thematischen Zusammenhang der Dissertation gehören, erscheinen in der Publikationsliste am Ende der Arbeit. Eine Beteiligung an der Durchführung der experimentellen Arbeiten und an der Verfassung des Manuskripts meinerseits vor und während der Promotionsphase führte zur Aufführung im Autorenverzeichnis.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Defensin alpha 6 (*DEFA 6*) overexpression threshold of over 60 fold can distinguish between adenoma and fully blown colon carcinoma in individual patients

Mariya Y Radeva^{1*}, Franziska Jahns², Anne Wilhelm², Michael Gleit², Utz Settmacher³, Karl Otto Greulich¹, Henning Mothes³

Abstract

Background: It is known that alpha-defensin expression is enhanced in colon cancer. However, the expression of human alpha defensin 6 (*DEFA 6*) in earlier stages, such as adenoma, has so far not yet been studied in a patient resolved manner.

Methods: By using quantitative Real Time-PCR, the gene expression pattern of *DEFA 1-3* and *DEFA 6* was analyzed in tissue of different stages of carcinogenesis, derived from colorectal cancer patients. In addition to paired normal and tumor tissue, matched normal near tumor and adenoma tissue samples were examined.

Results: The median gene expression of human defensin alpha 6 (*DEFA 6*) has been found to be moderately increased (~5 fold) in tumor samples derived from individuals with colorectal cancer (CRC) when compared to their normal counterparts. However, when the data were analyzed in a patient-wise manner, a large expression variation among individual patients is found, making the use of *DEFA 6* for individual diagnosis of fully blown colon carcinoma difficult. Surprisingly, in adenoma the gene expression analysis revealed a 100 fold increased median expression of *DEFA 6* relative to normal colon tissue. 13/18 samples had an individual overexpression of more than 60 fold in adenoma but only 3/17 in carcinoma. In each of the individual patients, at least either the adenoma or the carcinoma showed strong *DEFA 6* overexpression.

Conclusions: We suggest that the expression of *DEFA 6* preferably can be used as a potential diagnostic marker for adenoma and not as a marker for fully blown carcinoma. This is supported by the fact that *DEFA 6* is a downstream target of the Wnt pathway, which is mutational active during the earliest stage of cancer development.

Background

Human neutrophilic (*DEFA 1-3*) and enteric (*DEFA 6*) alpha defensins are cationic short peptides of 29 to 42 amino acids in length with known functional activities in innate antimicrobial immunity [1-3]. While *DEFA 1-3* are major components of the dense azurophilic granules of neutrophils, *DEFA 6* is primarily expressed in the lysozyme-rich granules of the Paneth cells of the small intestine [4], but also found in intermediate cells [5]. As

involved in the host defense of the gut, the expression of alpha defensins is usually found to be elevated in chronically inflamed colon, but not in the respective healthy tissues [5,6]. Furthermore, several studies already reported the elevated alpha defensin expression in various tumour types, suggesting their potential to be used as tumour markers [6-9]. Their expression was shown to be enhanced in fully blown colon cancer tissue, though an evaluation of individual patient's data has not yet been reported [10-12]. More interestingly, in contrast to *DEFA 1-3*, which has been shown to be an unspecific colon cancer marker, *DEFA 6* is more tissue specific due to its high expression in colon cancer as compared to other tumors [11].

* Correspondence: mradeva@fli-leibniz.de

¹Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstr. 11, 07745 Jena, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

This study attempts to test whether DEFA 6 can be used as marker of the adenoma stage of colon cancer and not solely, as already described in literature, as a marker of fully blown colorectal cancer. The emphasis is on evaluating the data on an individual patient's basis before pooling the data, since a high median overexpression, at large variation of the individual patient's data, would not be really suited for a diagnosis.

Methods

Tissue sample preparation for gene expression analysis

Tissue samples were prepared as described in Radeva et al [13]. In short, the normal colon samples from each patient with colon cancer were taken at a distance of 20 to 50 cm from the tumor site. Confirmation of the tumor stage of the patients was provided by pathological examination after the surgery (Table 1). In addition to the adenoma, macroscopically normal tissues, removed at distance 1 to 5 mm apart from the tumor were collected. All of the obtained adenoma samples were benign. Only hyperplastic polyps and villous or tubular adenomas were taken, but not flat serratous adenomas since these might have different pathology.

Ethics

The research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration. Furthermore, the study was institutionally approved by the ethics committee of University Hospital of Jena, Germany (Reference number 1601-08/05). Prior to tissue collection, verbal consent was obtained from all analysed patients.

Total RNA extraction from tissue samples. cDNA preparation

Total cellular RNA preparation was performed as described in Radeva et al [13]. In short, RNA was isolated from epithelium colon stripes using RNeasy Mini

Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Integrity of the isolated total RNA was checked by using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). cDNA synthesis was performed as described earlier [13]. However, due to the variability of the quantity of the extracted total RNA, the amount used as an initial material for the performance of the cDNA synthesis varied (ranged from 10 ng to 300 ng total RNA).

Design of primers

All primer pairs were designed using freely available Primer3 software, version 0.4.0 <http://frodo.wi.mit.edu/>. To assess the primer specificity, basic local alignment search tools (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were applied. The amplicon size varied within the range from 160 bp to 222 bp. Sequences of the used primer pairs are shown in Table 2. Besides the lack of DEFA 2 gene, the sequence of the genes encoding DEFA 1 and DEFA 3 differ by only 2 nucleotide substitutions [14], therefore one primer pair was used for detection of all neutrophilic defensins. For further verification of the primer specificity, the products amplified by defensin's primer pairs were sequenced.

Verification of the primer's specificity

To verify the primer specificity and to ensure that the designed primer pairs were not amplifying additional products in the presence of genomic DNA, *in-silico* PCR, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=-start> was implemented. In addition to this computational procedure, experimental approach such as standard polymerase chain reaction (PCR) was carried out. For generation of the amplicon, reflecting the relative abundance of certain target gene, the gene specific primers were tested in a presence of various templates, such as genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA). Non-template control reaction (NTC) that contains all essential components of the amplification reaction except the template enables detection of contaminations.

Amplification was performed using Go Tag DNA Polymerase (Promega) with the following thermal conditions: 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and as a last step, final extension at 72°C for 10 min was run. On Figure 1, representative examples are shown. If the primers are specific, amplicon with correct size should be observed only in case where cDNA was used as a DNA template.

PCR reaction efficiency

Validation of the PCR reaction efficiency and the performance of the quantitative RT-PCR assay was done as previously described [13]. Two microliters cDNA

Table 1 Clinicopathological characteristics of 17 patients

Patient and tumor characteristics	Number of cases
Age	Mean age 68.7 ± 9.3
Gender	13 males, 4 females
Type of analyzed tissue*	
Normal	17
Normal near Tumor	9
Adenoma	18**
Tumor	17*** (1 with G1, 6 with G2; 8 with G3; 1 with G4)

*Four different types of tissues were examined for expression of DEFA 1-3, DEFA 6 and β -actin genes.

**One donor has two types of adenoma.

***For 1 out of 17 analyzed donors the clinical description about the grade of the tumor was not available. In addition, 1 out of the total 17 donors investigated does not possess tumor tissue.

Table 2 Sequence of oligonucleotide primers used for PCR amplification and product size predicted for sample cDNA

Gene name	Gene annotation	RefSeq ID	Sequence	Amplicon size
DEFA 1-3*	Defensin, alpha 1 to 3	<u>NM_005218.3</u> <u>NM_005217.2</u>	CCTGCCTAGCTAGAGGATCTGTG TGTTTTTCCTTGAGCCTGGA	222 bp
DEFA 6*	Defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	<u>NM_001926.2</u>	CTCAAGTCTTAGAGCTTTGGGCT GGACACACGACAGTTTCCTTC	198 bp
β -actin*	Beta actin	<u>NM_001101</u>	AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT CCCACGATGGAGGGGAAGAC	160 bp

*All primers are listed as 5' to 3'.

prepared from different starting concentration of total RNA was used as a template. Prior further evaluation, the data was additionally normalized to definite starting concentration in order to remove the errors introduces due to uneven sample quantities. The normalization algorithm is available from the authors upon request.

Statistical analysis

All samples were amplified in duplicate or triplicate and the means were obtained for further calculations. In all samples analyzed, the mRNA of each target gene was normalized to that of the β -actin mRNA. The relative RNA expression was calculated using the following formula:

$$2^{-(Ct \text{ reference} - Ct \text{ gene of interest})}$$

where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. The averaged Ct value for the reference gene was subtracted from the averaged Ct value of the selected gene of interest.

The data was exported to GraphPad Prism Software, version 4 (Graph Pad, San Diego, USA). Comparisons between two groups were made using Wilcoxon matched

pairs test. Overall differences between multiple groups were tested using the nonparametric Kruskal-Wallis test.

Results

Gene expression profiling of human subjects

In the present work, the expression of *DEFA 6* gene was tested and compared with the respective expression of *DEFA 1-3* genes. For this purpose, tissue samples of 17 CRC patients were studied. Since the gene expression analysis of fully blown carcinoma does not account for the expression alterations that are critical for the initiation and the development of cancer, in addition to the classical combination of paired normal and tumor tissue, also matched normal near tumor and adenoma tissue samples were examined by qRT-PCR.

Low abundance of *DEFA 1-3* expression in colon tissues

The expression of *DEFA 1-3* genes was investigated in normal and the related normal near tumor, benign adenoma and tumor tissue samples derived from 17 patients in total. Resume of the performed quantitative Real Time-PCR is presented in Figure 2.

Transcription levels of *DEFA 1-3* mRNA, in all colon tissues investigated were relatively low, when compared to the expression of *DEFA 6* (see below). Although low

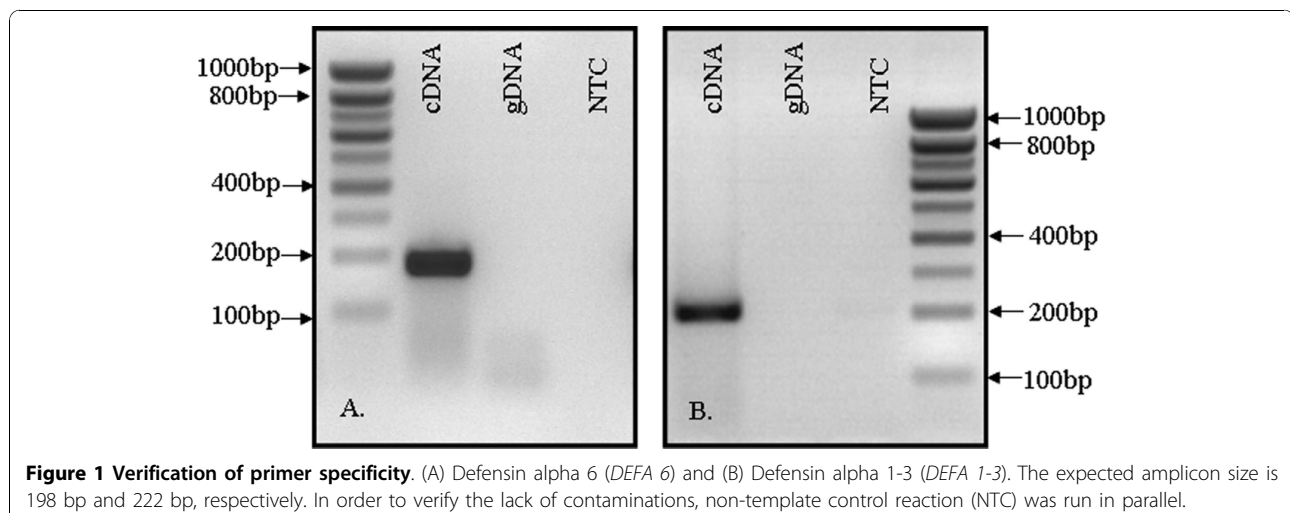


Figure 1 Verification of primer specificity. (A) Defensin alpha 6 (*DEFA 6*) and (B) Defensin alpha 1-3 (*DEFA 1-3*). The expected amplicon size is 198 bp and 222 bp, respectively. In order to verify the lack of contaminations, non-template control reaction (NTC) was run in parallel.

abundant, *DEFA 1-3* mRNA was significantly up-regulated in adenoma and tumor tissues compared to the normal samples with ~4- and 6.4-fold, respectively (Wilcoxon test, $p = 0.0007$ (adenoma vs. normal), $p = 0.02$ (tumor vs. normal)). Moreover, the expression in normal near tumor was also increased by factor of 2.8 over normal tissue (Wilcoxon test, $p = 0.04$). The expression alterations among normal near tumor, adenoma and tumor colon tissues were relatively small, in the range of 1.33 to 1.4 fold, and according to the performed Wilcoxon matched pairs test all of these differences were not statistically significant ($p > 0.5$).

In summary, the presented results verified the general observation of *DEFA 1-3* elevation in colon tumors, which consist of a mix of different cell populations such as epithelial cells, a small percentage of fibroblasts and leukocytes. Therefore, it is still unclear whether the invasion of the neutrophils or the defensin production by the cancer cells themselves is the reason for the altered *DEFA 1-3* expression in colon cancer tissues samples [6,8,15,16].

A burst of *DEFA 6* in benign adenoma

As for *DEFA 1-3*, the expression of *DEFA 6* gene was investigated across the adenoma-carcinoma axis. The outcome of the analysis is summarized in Figure 3.

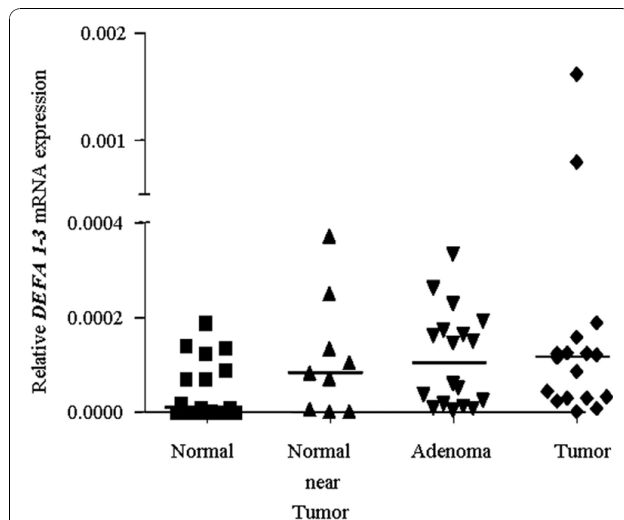


Figure 2 Gene expression of *DEFA 1-3*. The *DEFA 1-3* expression was normalized to β -actin, in normal, normal near tumor, adenoma and the respective tumor tissue samples. For better visualization the scale was segmented with suppression of the highest values. The horizontal lines represent the median over all investigated patients. Differences between multiple groups were tested using Kruskal-Wallis test. Significant up-regulation was observed in adenoma tissue over the related normal colon tissue ($*p < 0.05$). The rest of the comparisons did not show significance according to the test ($p > 0.05$).

The increase in *DEFA 6* expression when compared to the rest of the tested groups is immediately evident. The horizontal lines represent the median expression of the population analyzed indicating significant increase with a 100 fold in adenoma over normal tissue (Wilcoxon test, $p = 0.0004$). Still large was the increase of *DEFA 6* in adenoma over the normal near tumor tissue (30.6 fold), and this expression's alteration, according to the applied Wilcoxon test, was significant ($p = 0.02$). When the median expression in tumor was compared with that in normal tissues, moderate increase with almost 5 fold was detected in fully blown tumors than in the non-malignant, normal samples, and those differences, based on the performed statistical test, were significant ($p = 0.012$).

A 100 fold average increase in one single stage of colon cancer development is a comparably strong genetic marker. However, the full potential of these data becomes only evident when it is presented in a patient specific manner. Thus, Figure 4 summarizes the computed *DEFA 6* expression ratio between adenoma and normal (rhombs) as well as between tumor and normal (squares) colon tissue, obtained from each single individual analyzed. The patient's characteristic such as age, gender and grade are denoted below the figure. No consistent dependence of *DEFA 6* expression ratios as a function of tumor grade, age or gender has been detected. The ratios in adenoma as well as in carcinoma as compared to normal tissue vary more than 1000 fold indicating the individuality of each patient's cancer. However, *DEFA 6* is overexpressed in all cases either in adenoma or carcinoma - which indeed means that all

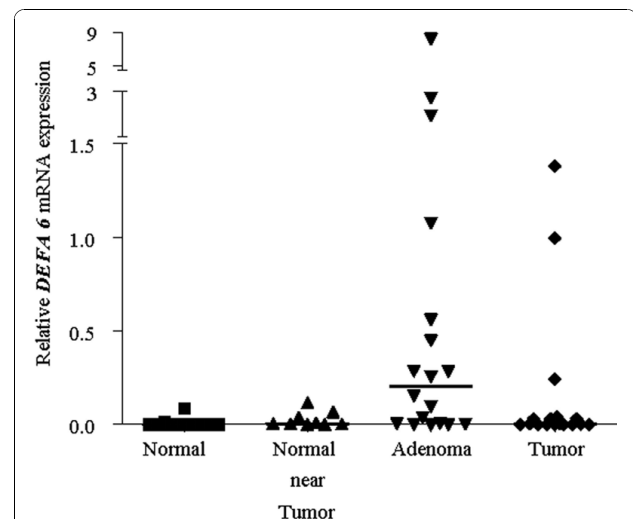


Figure 3 Relative gene expression of *DEFA 6* as already described for Figure 2. According to the performed Kruskal-Wallis test, the median expression in adenoma as compared to normal tissue was significantly elevated ($p < 0.001$).

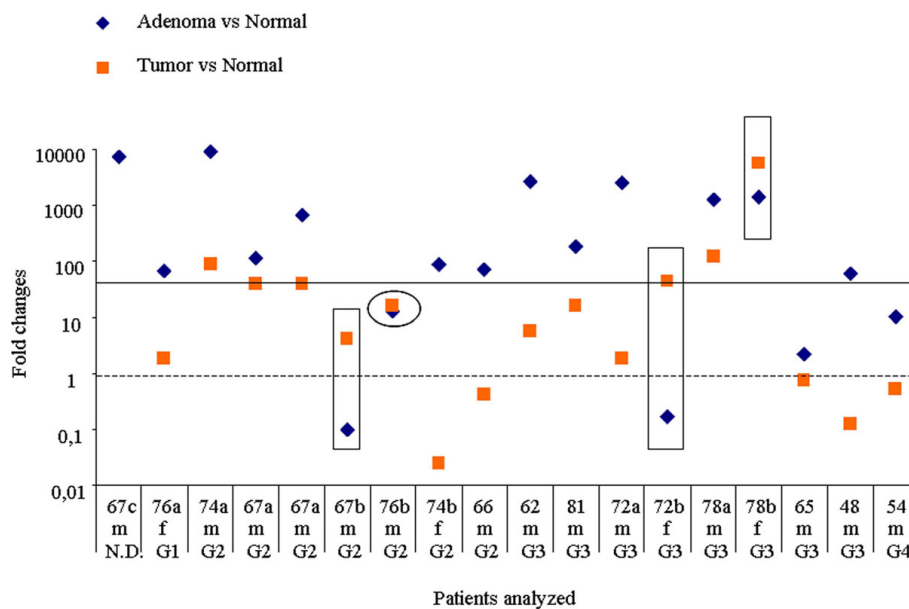


Figure 4 Up or down - regulation of DEFA 6 expression in 17 individuals*. *One of the donors had two adenomas, therefore the figure show 18 samples. The patients are characterized for their age, gender and grade of cancer. N.D. means that the stage was not determined. The scale of the y axis is logarithmic. None of the patients has simultaneously down-regulated DEFA 6 in both, adenoma as well as fully blown cancer. The dotted horizontal line at 1 indicates that DEFA 6 expression would be un-effected. For the first patient on the left, no comparison of adenoma with carcinoma was possible, since the donor had developed only adenoma. From the 17 other samples, 13 revealed a higher expression in adenoma than in carcinoma, 1 case (encircled) showed essentially no change and 3 objects (in rectangular boxes) had the highest expression in carcinoma.

those tissue samples can be characterized as no longer normal. In addition, in 13/18 cases (72%) an overexpression of more than 60 fold indicates an adenoma (see Figure 4, the black horizontal line is empirical and separates all samples with overexpression of 60 or more fold from the rest of the samples). Most of the tumor tissues showed overexpression with less than 60 fold. In addition, we did not find a correlation between the DEFA 6 expression in adenoma and carcinoma which might be systematically related to the grade of the tumor.

Discussion

Enhanced alpha-defensin gene expression can be detected in samples such as stool [16], serum, plasma [6,10] and colon tissue [11,12,15] derived from colorectal cancer patients. In this sense, our results on the DEFA 6 gene in colon cancer tissues is in agreement with Nam et al. There by ELISA, DEFA 6 was also found to be enhanced on the protein expression level in serum from colorectal cancer patients indicating a good correlation between DEFA 6 mRNA and protein expression. DEFA 6 showed even a higher diagnostic sensitivity and specificity than CEA, the most widely used marker for colon cancer diagnosis [11]. Thus, the observed stable correlation between DEFA 6 mRNA and protein expression indicates that no dramatic posttranscriptional regulation

occurs. It would also be interesting to address the question what are the serum DEFA 6 expression levels of patients with adenoma only. However, such patients are difficult to be obtained due to the fact that in most of the cases the patient is diagnosed too late, when the carcinoma has been already fully developed.

In adenoma, we detected extremely high DEFA 6 expression in almost all individual patients. This makes DEFA 6 a suitable target for diagnosis of individuals. In 12 out of 17 samples the effect of DEFA 6 overexpression in adenoma was reverted in the fully blown tumor. Thus, DEFA 6 expression in tumor was distinctly lower compared to adenoma, but still remained higher than in normal tissue.

To our best knowledge this is the first study demonstrating a gene expression explosion of DEFA 6 in premalignant adenoma obtained from patients with colorectal cancer. This striking result suggest that the high DEFA 6 overexpression is the hallmark of adenoma, since the expression threshold of 60 fold (see Figure 4) discriminates adenoma from carcinoma in a sharper way than many other disease markers for individual patients and may thus be envisioned as a simple auxiliary diagnostic tool for the clinical histologist.

Neoplastic tissue is well known to be heterogeneous. Thus, a large proportion of adenoma and carcinoma

cells showed different expression levels of various targets under investigation. As an example, Ki-67 and Myc, known markers for proliferation, were found to be over-expressed in areas of increased cell proliferation [17,18]. On other hand, Andreu et. al reported that the *DEFA 6* mRNA expression level was elevated in tumors, where Myc and Cyclin D were accumulated as well [19]. This is not surprising due to the fact that the three genes are known to be down stream targets of the same pathway, namely Wnt pathway. Therefore, if within the tumor the mRNA expression of *DEFA 6* is in stable positive correlation with the mRNA expression of well known proliferation markers, such as Myc, strong *DEFA 6* expression can be seen in areas of the tumor associated with a higher proliferation.

Conclusions

To our knowledge this is the first study demonstrating a strong burst of the *DEFA 6* gene in human adenoma tissue samples. This observation immediately indicates the potential of *DEFA 6* to be used as a marker for early premalignant stages of colorectal cancer and not solely as a marker for colon cancer detection.

Acknowledgements

This work was supported by the Thüringer Ministry of Technology and Labour, grant B 309-05001 and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant Po 284-8-3 and well as by Günther Hänisch foundation.

Author details

¹Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstr. 11, 07745 Jena, Germany. ²Friedrich Schiller University Jena, Department of Nutritional Toxicology, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany. ³University Hospital Jena, Department of General, Visceral and Vascular Surgery, Erlanger Allee 101, 07747 Jena, Germany.

Authors' contributions

MR designed the experiments, carried out the main part of the studies with patient material as well as MR performed the statistical analysis and wrote the manuscript. FJ and AW participated in the performance of the gene expression analysis of patient material. HM and US performed the surgery and provided the colon tissue material. KOG and MG initiated the study, participated in its supervision, design and coordination as well. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 25 September 2009 Accepted: 27 October 2010
Published: 27 October 2010

References

1. Menendez A, Finlay BB: Defensins in the immunology of bacterial infections. *Current Opinion in Immunology* 2007, **19**:385-391.
2. Kuwano K, Tanaka N, Shimizu T, Kida Y: Antimicrobial activity of inducible human beta defensin-2 against *Mycoplasma pneumoniae*. *Current Microbiology* 2006, **52**:435-438.
3. Cunliffe RN, Kamal M, Rose FRAJ, James PD, Mahida YR: Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of Clinical Pathology* 2002, **55**:298-304.

4. Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D: Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 1991, **251**:1481-1485.
5. Cunliffe RN, Mahida YR: Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* 2004, **75**:49-58.
6. Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Thieme H, Kaufmann R, Mothes H, Settmacher U, Claussen U, Halbhuer KJ, von Eggeling F: Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005, **129**:66-73.
7. Muller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Muller GA, Flad T: Human alpha-defensins HNP-1,-2, and-3 in renal cell carcinoma - Influences on tumor cell proliferation. *American Journal of Pathology* 2002, **160**:1311-1324.
8. Holterman DA, Diaz JJ, Blackmore PF, Davis JW, Schellhammer PF, Corica A, Semmes OJ, Vlahou A: Overexpression of alpha-defensin is associated with bladder cancer invasiveness. *Urol Oncol* 2006, **24**:97-108.
9. Lundy FT, Orr DF, Gallagher JR, Maxwell P, Shaw C, Napier SS, Cowan CG, Lamey PJ, Marley JJ: Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue. *Oral Oncology* 2004, **40**:139-144.
10. Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H: Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *Bmc Cancer* 2005, **5**.
11. Nam MJ, Kee MK, Kuick R, Hanash SM: Identification of defensin alpha 6 as a potential biomarker in colon adenocarcinoma. *Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**:8260-8265.
12. Albrethsen J, Moller CH, Olsen J, Raskov H, Gammeltoft S: Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 2006, **42**:3057-3064.
13. Radeva M, Hofmann T, Altenberg B, Mothes H, Richter KK, Pool-Zobel B, Greulich KO: The database dbEST correctly predicts gene expression in colon cancer patients. *Curr Pharm Biotechnol* 2008, **9**:510-515.
14. Daher KA, Lehrer RI, Ganz T, Kronenberg M: Isolation and Characterization of Human Defensin Cdna Clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**:7327-7331.
15. Zhang K, Lu QH, Zhang Q, Hu X: Regulation of activities of NK cells and CD4 expression in T cells by human HNP-1,-2, and-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **323**:437-444.
16. Zou H, Harrington JJ, Sugumar A, Klatt KK, Smyrk TC, Ahlquist DA: Detection of colorectal disease by stool defensin assay: An exploratory study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007, **5**:865-868.
17. Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E, Tahara H, Ide T, Haruma K, Yasui W, Kajiyama G, Tahara E: In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J Cancer Res* 1998, **89**:1187-1194.
18. Arango D, Mariadason JM, Wilson AJ, Yang W, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Augenlicht LH: c-Myc overexpression sensitises colon cancer cells to camptothecin-induced apoptosis. *Br J Cancer* 2003, **89**:1757-1765.
19. Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, Niwa-Kawakita M, Laurent-Puig P, Kahn A, Robine S, Perret C, Romagnolo B: Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 2005, **132**:1443-1451.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/588/prepub

doi:10.1186/1471-2407-10-588

Cite this article as: Radeva et al.: Defensin alpha 6 (*DEFA 6*) overexpression threshold of over 60 fold can distinguish between adenoma and fully blown colon carcinoma in individual patients. *BMC Cancer* 2010 **10**:588.

2.2 Publikation II: Butyrate suppresses mRNA increase of osteopontin and cyclooxygenase-2 in human colon tumor tissue. Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Nadja Jablonowski, Henning Mothes, Mariya Radeva, Anja Wölfert, Karl Otto Greulich, Michael Gleis. *Carcinogenesis*, 2011; 32(6):913-20.

Das Fermentationsprodukt Butyrat, welches beim Abbau von Ballaststoffen im Kolon gebildet wird, besitzt chemoprotektive Eigenschaften, die mit einem verminderten Risiko für die Entstehung von Kolorektalkarzinomen assoziiert werden. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der kurzkettigen Fettsäure auf die für Osteopontin (OPN) und Cyclooxygenase (COX)-2 kodierenden Gene in humanem Normal-, Adenom- und Tumorgewebe (Kolon) desselben Spenders zu bestimmen. COX-2 und OPN spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung bzw. Ausbreitung von Tumoren im Körper.

Die Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real-time PCR zeigten eine erhöhte Expression von *OPN* und *COX-2* in den Tumorgeweben im Vergleich zu den jeweiligen Normalgeweben. Die Behandlung der Gewebeproben mit Butyrat führte zu einer Reduktion des medium- bzw. kultivierungsbedingten mRNA-Anstiegs beider Gene in allen drei Gewebetypen *ex vivo* (Tumore: mediane Reduktion 35 % (*COX-2*) bzw. 50 % (*OPN*). Tumore mit einer niedrigen *OPN*-Basalexpression zeigten sich dabei gegenüber Butyrat empfindlicher als solche mit einem hohen basalen Ausgangslevel. Der umgekehrte Fall scheint für die Expression von *COX-2* im nicht-transformierten Kolongewebe zu gelten. Die Proteinexpression von *OPN* und *COX-2*, die mittels Western Blot und/oder Enzymimmunoassays ermittelt worden war, konnte den Einfluss von Butyrat jedoch nicht widerspiegeln. Die mRNA-Expression korrelierte nur bei 40-63 % der Spender mit den jeweiligen Proteinmengen von *OPN* und PGE_2 , dem Hauptmediator der *COX-2*. Trotz eines partiell protektiven Potenzials bedarf es zukünftig weiterer Untersuchungen, die den Einfluss von Butyrat auf die Synthese von *OPN* und PGE_2 genauer definieren.

Eigenanteil:

- Aufarbeitung und Inkubation der Kolongewebeproben mit Butyrat
- RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse (Real-time PCR)
- Zytosolextraktion, Proteinbestimmung und Proteinexpressionsanalyse (Western Blot)
- Bestimmung der Gehalte an PGE_2 und *OPN*
- Auswertung, Darstellung und Interpretation der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskripts

Butyrate suppresses mRNA increase of osteopontin and cyclooxygenase-2 in human colon tumor tissue

F.Jahns^{1,2,*}, A.Wilhelm^{1,2}, N.Jablonowski¹, H.Mothes³,
Mariya Radeva², A.Wölfert⁴, K.O.Greulich² and M.Glei¹

¹Department of Nutritional Toxicology, Institute of Nutrition, Friedrich-Schiller-University Jena, Dornburger Straße 24, 07743 Jena, Germany, ²Department of Single Cell and Single Molecule Techniques, Leibniz Institute of Age Research/Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstraße 11, 07745 Jena, Germany, ³Department of General, Visceral and Vascular Surgery, Friedrich-Schiller-University Jena, Erlanger Allee 101, 07745 Jena, Germany and ⁴Institute of Pathology, Friedrich-Schiller-University Jena, Ziegmühlweg 1, 07743 Jena, Germany

*To whom correspondence should be addressed. Tel: + 49 3641 949669;
Fax: + 49 3641 949672;
Email: franziskajahns@aol.com

The short chain fatty acid (SCFA) butyrate, a product of fermentation of dietary fiber in the human colon, is found to exert multiple regulatory processes in colon carcinogenesis. The aim of this study was to find out whether butyrate affects the tumor-promoting genes *osteopontin (OPN)* and *cyclooxygenase (COX)-2*, their respective proteins and/or their functional activity in matched normal, adenoma and tumor colon tissues obtained from 20 individuals at colon cancer surgery. Quantitative real-time polymerase chain reaction experiments showed increased levels of *OPN* and *COX-2* messenger RNA in tumor tissues when compared with the adjacent normal samples ($P < 0.001$). The addition of butyrate reduced *OPN* and *COX-2* mRNA expression in all tissue types compared with the related medium controls (tumor: $P < 0.05$). In tumor samples, a downregulation of up to median 35% (*COX-2*) and 50% (*OPN*) was observed, respectively. Thereby, tumors with lower levels of *OPN* basal expression were more sensitive to inhibition and vice versa for *COX-2* in normal tissue. At the protein and enzyme level, which were determined by using western blot and enzyme immunometric assays, the impact of the SCFA was not clearly visible anymore. The active proteins of *OPN* and *COX-2* (determined by prostaglandin E₂) were found to correlate with their respective mRNA expression only in 50–63% of analyzed donors.

For the first time, our data reveal new insights into the chemoprotective potential of butyrate by showing the suppression of *OPN* and *COX-2* mRNA in primary human colon tissue with the strongest effects observed in tumors.

Introduction

Colorectal cancer is the third most frequent malignancy in men and the second in women worldwide (1). The tumors develop in a multi-step process over years or decades and occur as sporadic colon cancer predominantly in the aging population.

Dietary fiber is believed to lower the risk of colon carcinogenesis (2,3). The indigestible plant ingredients are fermented by the colonic microflora resulting in the formation of short chain fatty acids (SCFA) such as acetate, propionate and butyrate which seem to contribute to this impact. Besides its physiological relevance as an energy source, butyrate revealed chemopreventive properties against colorectal carcinogenesis via induction of apoptosis and differentiation, inhibition of proliferation and modulation of stress and detoxification-related genes (4–6). These apparent opposite effects of butyrate on normal

Abbreviations: AA, arachidonic acid; COX-2, cyclooxygenase-2; HDAC, histone deacetylase; mRNA, messenger RNA; OPN, osteopontin; PCR, polymerase chain reaction; PGE₂, prostaglandin E₂; SCFA, short chain fatty acid.

and malignant colon cells are described as ‘butyrate paradox’ in the literature (7).

Presently, only few data is available concerning the impact of butyrate on tumor-promoting genes and their analog proteins which are often modified during the development of cancer. Osteopontin (OPN) and cyclooxygenase (COX)-2 are substantially involved in tumor growth and spreading and therefore represent promising targets in cancer therapy (8,9). OPN is a secreted glycosylated phosphoprotein located in the extracellular matrix. As an adhesion protein mediating cell attachment via interactions with integrins and CD44 variants and as a cytokine, it is acting physiologically in diverse cellular processes like immune response, bone mineralization and survival (10). In accordance with the pathological stage and patient’s survival, OPN was found in elevated levels in a variety of cancers (e.g. breast, lung, colon) (11,12) where it is implicated in tumor cell invasion and metastasis (13,14).

COX-2, the inducible and partly constitutive expressed isoform of COXs, is involved in the synthesis of prostaglandins that are particularly active in pathophysiological processes, like inflammation, pain, fever and tumor development (15). Over 70% of colorectal carcinomas and a subset of adenomas showed elevated levels of this protein (16,17). The expression of COX-2 and its principal metabolite prostaglandin E₂ (PGE₂) promote tumor growth by influencing characteristic attributes of cancer cells including invasion, angiogenesis and apoptosis (18).

A suppression of *OPN* and *COX-2* messenger RNA (mRNA) and protein has been associated with a decreased metastatic spread, an inhibition of cell growth and an induction of apoptosis (9,19,20). Much of this work has employed colon cancer cell lines or animal models just as studies with butyrate. The aim of the present study was therefore to investigate the impact of a physiologically relevant dose of butyrate on gene expression and protein/enzyme levels of OPN and COX-2 in human colon tissues with different malignancy degree *ex vivo*. The outcomes shall provide new insights whether surgical colon cancer tissue responds to butyrate in a manner similar to colon cancer cell lines and build a bridge to clinical research.

Material and methods

Patient material

Colon tumor and respective normal tissues were obtained from 20 patients with colorectal cancer who underwent surgical resection at the University Hospital of Jena. Five of them also displayed benign adenomas which were additionally resected. The study was approved by the ethical committee of the University of Jena (no. 1601-08/05) and all patients gave their informed consent. The group consisted of 8 men and 12 women with a mean age of 70.5 ± 13.2 years. None of the patients has received chemotherapy or radiation prior to surgery. After removal the tissue samples were stored in Hank’s balanced salt solution (8.0 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 0.06 g/l Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 0.06 g/l K₂HPO₄, 1 g/l glucose, 0.35 g/l NaHCO₃ and 4.8 g/l *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; pH 7.2), transported on ice to the laboratory and prepared immediately. The colon epithelium was separated from the normal colon tissue by perfusion-supported mechanical disaggregation (21), whereas adenoma and tumor tissues were cut into small pieces of approximately 0.3–0.5 cm². Tissue strips were either frozen in liquid nitrogen alone or submerged in RNA later (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at –80°C until cytosol or RNA was being extracted. Pathological examination of the colon tissues assessed tumor stage and grading according to the Union for International Cancer Control classification (Table I).

Treatment of colon tissue with butyrate

Simultaneously, strips from normal, adenoma and cancerous colon tissue were placed into six-well plates (two to three strips per well) and treated either with 0 mM (control) or 10 mM butyrate (diluted in primary cell culture medium) under sterile conditions at 37°C in a 95% humidified incubator (5% CO₂). The medium consisted of minimal essential medium with Earle’s salts enriched

Table I. Clinicopathological data of the patients analyzed in this study

Patient and tumor characteristics	Number of patients
Mean age (years) ± SD	70.5 ± 13.2
Gender	12 females, 8 males
Tumor stage	
I	2
II	6
III	8
IV	3
Tumor grading	
1	—
2	10
3	7
4	1

One of the donors was only found with adenoma. In case of another patient, the tumor grading was not reported.

with 20% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 µg/ml gentamycin, 2.5 µg/ml fungizone, 10 ng/ml epidermal growth factor, 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin and 5 ng/ml sodium selenite according to Rogler *et al.* (22). After incubation for 12 h, the tissue strips used for protein analyses were washed in Hank's balanced salt solution and frozen in liquid nitrogen. Samples for gene expression studies were additionally submerged in RNA later.

RNA isolation and complementary DNA preparation

After homogenization of the tissue strips in RLT Plus buffer with the Polytron homogenizer 2100 (Kinematica AG, Littau/Lucerne, Switzerland), total RNA was isolated by using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNA was eluted in 25 µl RNase-free water and quantified spectrophotometrically with the NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). RNA integrity was checked before complementary DNA synthesis with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Depending on the amount, 100–2500 ng of total RNA was reverse transcribed in a 20 µl reaction mix with Oligo(dT)_{12–18} primers using the SuperScript II First Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Subsequently, the remaining RNA was removed by RNase H (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) treatment.

Quantitative real-time polymerase chain reaction

The efficiency of the polymerase chain reaction (PCR) was verified for all primer pairs by previous experiments and was in the acceptable range of 95–105%. Two microliters complementary DNA (5–30 ng RNA equivalents) prepared from different starting concentrations of total RNA were used in a 25 µl PCR mix containing iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany), RNase-free water and 10 pmol gene-specific primers: *COX-2* forward, 5'-CGCTCAGCCATACAGCAA-3' and reverse, 5'-GAATCTGTCCGGGTA-CAATC-3'; *OPN* forward, 5'-TGGAAAGTTCTGAGGAAAAGCAG-3' and reverse, 5'-GGCTTTTCGTTGGACTTACTTG-3'; *β-actin* forward, 5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT-3' and reverse, 5'-CCCACGATGGAGGGGAA-GAC-3'; *β-glucuronidase (GUS)* forward, 5'-TGCAGGTGATGGAAGAA-GTG-3' and reverse, 5'-TTGCTCACAAGGTCACAGG-3'.

Quantitative PCR experiments were performed using the iCycler iQ Real time PCR Detection System (Bio-Rad). After an initial denaturation step of 2 min at 95°C, the amplification was carried out in 40 cycles involving denaturation (at 94°C for 30 s), annealing (at 60°C for 30 s) and extension (at 72°C for 30 s). The specificity of the PCR products was confirmed by a subsequent melting curve analysis. All samples were analyzed in duplicate.

The expression of the targets was normalized to the geometric average of two reference genes (*β-actin*, *GUS*) based on the equation of Pfaffl *et al.* (23) involving efficiency (E) and quantification cycle (C_q). Since the reaction efficiencies of all primer pairs were close to 100%, E was set to 2.

$$\text{Relative mRNA expression} = \frac{\sqrt{E^{C_q(\beta\text{-actin})} \times E^{C_q(\text{GUS})}}}{E^{C_q(\text{target})}}$$

Western blot analysis

For detection of protein, equally treated colon tissue material of the same donors used for mRNA analysis was examined. Because of difficulties in

OPN detection in previous experiments, only COX-2 protein expression was measured. Our investigations indicate that high protein amounts (≥40 µg) were necessary to verify COX-2 protein. Since cytosolic protein contents of the samples used in this study were often low (range 300–4900 µg/ml), the detection of COX-2 was restricted to a few donors.

Butyrate-treated (10 mM) and non-treated paired normal, adenoma and tumor tissues were homogenized with the Polytron homogenizer 2100 in cold lysis buffer (50 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂EDTA, 0.1% Triton X-100 and 1 mM Pefabloc; pH 7) and centrifuged (16 000g, 10 min, 4°C). Total protein contents were determined according to Bradford (24). For western blot analysis, 30–50 µg of total protein was mixed with 5× concentrated loading buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8; 10% sodium dodecyl sulfate; 50% glycerol; 0.1% bromophenol blue and 0.5 M dithiothreitol), separated by discontinuous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (stacking gel: 4%; separating gel: 12%) and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman, Florham Park, NJ). The membrane was blocked with 3% nonfat dried milk powder (β-actin: 5%; AppliChem, Darmstadt, Germany) and incubated with the following primary and secondary antibodies: rabbit anti-COX-2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), mouse anti-β-actin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), rabbit anti-mouse IgG-HRP (Dako, Hamburg, Germany) and goat anti-rabbit IgG-HRP (Dako). By using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), proteins were finally visualized and band intensities were quantified by densitometric measurement using Quantity One software, version 4.1 (Bio-Rad).

Determination of OPN and PGE₂ levels in cell culture supernatants

After 12 h butyrate treatment of colon epithelial tissues, cell culture media of all samples were collected and centrifuged (3900g, 10 min, 4°C) before being stored at –80°C. OPN and PGE₂ contents in the supernatants were determined by using commercially available enzyme immunoassay kits according to the manufacturer's manuals (OPN: Assay Designs, Ann Arbor, MI; PGE₂: Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Levels expressed as nanograms per microliter were normalized to the total protein content of the cultured tissue.

Statistical evaluation

Statistical analysis was performed by the nonparametric Wilcoxon matched pairs test or the Kruskal–Wallis test using GraphPad Prism Software 5 (GraphPad, San Diego, CA), comparing two and multiple groups, respectively. The relation between two parameters was evaluated by the Spearman's rank correlation test. Gender differences were identified by the Mann–Whitney test. All results reached significance when *P* < 0.05.

Results

Basal COX-2 and OPN mRNA expression

In this study, colon tissue material of 20 patients in total was used to examine basal mRNA expression levels of known tumor markers. The analysis revealed that *COX-2* mRNA was elevated in tumor as compared with normal colon tissue (*P* < 0.001, Figure 1A). Expression changes ranged from 0.72- to 278-fold (median of 6-fold). The *OPN* mRNA level was also increased in nearly all malignant tissues (except one, P2) when compared with the related normal counterparts (*P* < 0.001, Figure 1B). Thereby, *OPN* transcripts were present in 3- to 299-fold higher amounts by showing a median increase of 23-fold. Among the analyzed patients, some individuals were marked by extremely high *OPN* (P6, P14, P15) and/or *COX-2* mRNA levels (P6) in tumor tissue (fold changes >100) which indicates a patient-specific expression. However, due to the limited number of patients possessing premalignant lesions, the expression of both targets was not significantly (*COX-2*: *P* = 0.43, *OPN*: *P* = 0.58) changed in adenoma tissues when compared with the corresponding normal samples (Figure 1A and B).

Considering clinicopathological parameters, we demonstrated that gene expression of *COX-2* and *OPN* were not correlated with tumor stage and grading (data not shown). But in contrast to *COX-2*, *OPN* was observed to be increased by median 41-fold during the progression of benign adenomas to malign tumors (*P* < 0.05). The influence of age and gender was evaluated in normal as well as in tumor tissue (data not shown). Males tended to express more *COX-2* in normal colon tissue compared with females (*P* = 0.12). No difference between both groups was noted for *OPN*. Furthermore, neither the transcript amount of *COX-2* nor those of *OPN* was age-related in any of the tissue types.

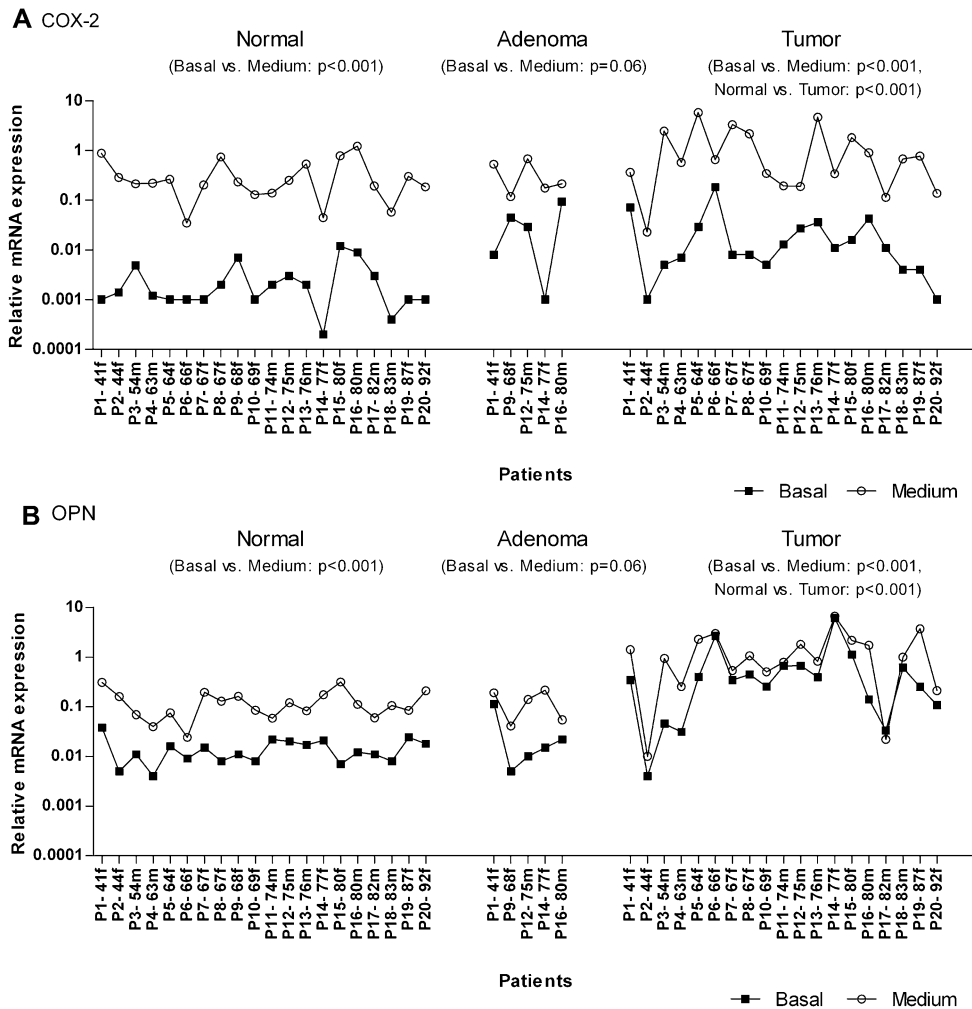


Fig. 1. Relative mRNA expression of *COX-2* (A) and *OPN* (B) and the influence of cell culturing in paired normal, adenoma and tumor colon tissue of 20 individual patients. mRNA levels were quantified before (0 h, closed squares) and after the treatment with medium (12 h, open circles) in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂) by using quantitative real-time PCR. Data are sorted by age of the patients (P), the small letter discriminates further between male (m) and female (f). For better visualization, basal levels and medium effects were each connected by a line.

Effect of incubation on *COX-2* and *OPN* mRNA expression

The primary cell culture medium served as solvent for the SCFA and therefore was used as a negative control. The incubation (12 h) with medium alone caused a multi-fold induction of both targets in normal as well as in the cancerous colon tissues. Thereby, *COX-2* expression was most affected by showing a median increase of 150-fold in normal ($P < 0.001$) and 81-fold in tumor colon tissue ($P < 0.001$) compared with the respective untreated counterparts (basal; Figure 1A). An induction of *COX-2* could also be observed in the premalignant adenoma tissue, which nevertheless appeared less susceptible than the other ones (median fold change 23, $P = 0.06$; Figure 1A).

In contrast, *OPN* gene expression was not altered so dramatically (Figure 1B). The incubation of normal and adenoma tissue strips in medium resulted in a comparable increase of *OPN* mRNA (normal: median fold change 8.65, $P < 0.001$; adenoma: median fold change 7.65, $P = 0.06$), whereas this influence was less apparent in tumor tissue (median fold change 2.08, $P < 0.001$).

Effect of butyrate on *COX-2* and *OPN* mRNA expression

To ascertain the effect of butyrate, the expression of butyrate-treated tissues had to be compared with the expression of the respective medium controls. The data indicate a modulation of mRNA expression of *COX-2* and *OPN* in tissues of different stage of transformation in response to butyrate (Figure 2).

COX-2 mRNA expression was tendentially reduced by butyrate in normal colon tissues when compared with the related non-treated controls (medium, $P = 0.07$). The majority of patients (16 of 20) exhibited a decreased transcript level by median 41% (fold change 0.59). In adenoma and tumor tissues, similar results could be observed whereby the reduction of *COX-2* mRNA expression in the malignant group achieved significance (median fold change 0.65, $P < 0.05$). Here, 14 of 20 donors showed decreased transcript levels after butyrate treatment, whereas all adenoma samples were found with reduced *COX-2* mRNA levels (median fold change 0.63, $P = 0.06$). When the effects of butyrate in normal and tumor tissue were compared, the applied Wilcoxon matched pairs test confirmed that no differential regulation of *COX-2* is present (Figure 2A).

The influence of butyrate on *OPN* gene expression was significantly depending on the tissue type. Although butyrate only insignificantly suppressed the medium-induced *OPN* mRNA increase by median 14% in normal colon mucosa (fold change 0.86), the amount of transcripts was downregulated by almost half in the malignant tumors (median fold change 0.48). Here, the expression of nearly all patients (15 of 20) exhibited a fold change < 1 after butyrate treatment indicating a decreased gene expression. The rest appeared to be insensitive to the SCFA. In the pre-stage of tumor, adenoma, *OPN* gene expression was observed to be even more affected by butyrate as in the fully blown carcinomas. All the benign tissues of

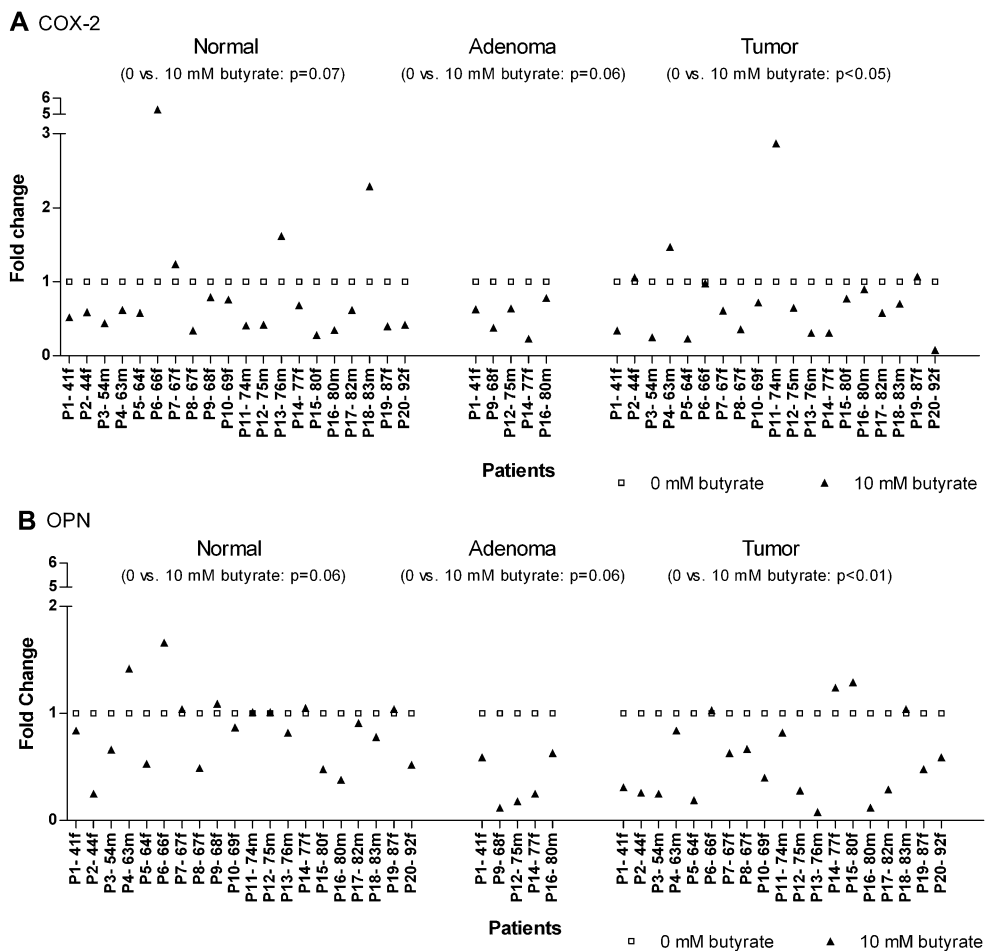


Fig. 2. Effect of butyrate (filled triangles) on *COX-2* (A) and *OPN* (B) mRNA expression in matched normal, adenoma and tumor colon tissue of 20 individual donors. Relative *OPN* and *COX-2* mRNA levels were determined after butyrate treatment (10 mM, 12 h) by quantitative real-time PCR and compared with the respective medium controls (open squares) which were set to 1. Results are listed by age of the patients (P), the small letter discriminates further between male (m) and female (f).

the five donors investigated showed a butyrate-suppressed expression by median 75% (fold change 0.25, $P = 0.06$) (Figure 2B).

Considering the clinicopathological characteristics of patients, no correlation between gender, age, tumor stage or grading and the individual effect of butyrate was found (data not shown). Further correlation analyses revealed that both genes appeared to be altered depending on their basal expression and the tissue type. The initial transcript amount of *COX-2* in normal colon epithelium (no effect in adenoma and tumor) correlated negative with the respective fold change after butyrate treatment ($P < 0.05$, $r = -0.46$, Figure 3A). This means that normal epithelia with higher levels of *COX-2* expression were more sensitive to inhibition by butyrate as those with lower expression. In transformed tissue, an inverse correlation was found for *OPN*. Here, levels of *OPN* expression were more downregulated by the SCFA when the initial expression was low than at originally high expression ($P < 0.05$, $r = 0.50$, Figure 3B). Similar findings were also made in adenoma tissue ($P = 0.08$, $r = 0.90$, data not shown).

Effect of butyrate on *COX-2* protein expression

Since basal expression levels of *COX-2* protein were inconsistent in normal and tumor tissues and not meaningful when compared with the gene expression results (data not shown), we have focused on the analysis of *COX-2* levels after *in vitro* culturing. Generally, only moderate changes of *COX-2* protein expression were observed in response to butyrate. Data of six patients showed median fold changes of 1.30 in normal tissue and 0.87 in cancerous tissue. A comparison of the gene and protein expression outcomes of these six donors revealed

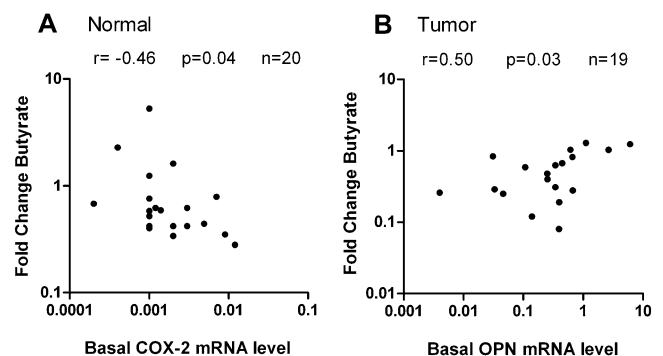


Fig. 3. Influence of the initial transcript level on the effect of butyrate in colon tissue. Both parameters, each determined by quantitative real-time PCR in paired normal, adenoma and tumor tissue of 20 individual colon cancer patients (closed circles), were plotted against each other and significant outcomes of the Spearman correlation are presented. (A) In normal tissue, *COX-2* was more strongly downregulated by butyrate at original high expression. (B) In contrast to *COX-2*, butyrate suppressed *OPN* gene expression in tumor more effectively when originally less mRNA was present.

no correlation (data not shown). The western blot analysis showed either less, no or adverse effects at *COX-2* protein level in normal as well as in tumor colon tissue. Nevertheless, we suppose a link between the response to butyrate and age of the patients. Combining the

data of normal and tumor tissue, the protein fold change (effect of butyrate compared with related medium control) was observed to be above the mRNA fold change after butyrate treatment with increasing age of donors indicating a posttranscriptional regulation of *COX-2* mRNA ($r = 0.47$, $P = 0.15$).

Effect of butyrate on secreted PGE₂ and OPN levels

Because of problems in respect of the detection of COX-2 protein by western blot due to insufficient total protein amounts, the functional consequence of a possible downregulation by butyrate was examined by measuring the amount of PGE₂, the main mediator of COX-2, using enzyme immunoassay. The assay was performed with patient material ($n = 8$) which mainly showed a decreased *COX-2* mRNA expression after butyrate incubation.

PGE₂ was well detectable in the cell culture supernatants (300–4000 pg/ml) derived from normal colon tissues treated with medium. After normalization to the total tissue protein content, similar high levels were observed in the media with exception of one donor (P4) showing a remarkably higher PGE₂ concentration than the others (Figure 4A). Exposure of normal tissue to butyrate (10 mM) had only a marginal influence on PGE₂ contents (median fold change: 0.80; Figure 4A). Solely two donors with strong modified PGE₂ levels (fold changes 0.06 and 7.28) were identified after treatment with the SCFA.

The respective tumor samples released median 1.63-fold more PGE₂ into the medium (Figure 4A and B) as the normal counterparts (range of raw values: 3000–10 000 pg/ml). The influence of the SCFA was controversial: half of the patients exhibited a reduced tumor-derived PGE₂ level, whereas the rest showed slightly increased levels

(median fold change 0.62; Figure 4B). In adenoma samples, no meaningful results were obtained (data not shown).

A comparison of PGE₂ levels and the respective *COX-2* mRNA expression revealed no significant correlation in both tissues (Figure 4C and D). In general, the *COX-2* transcript amount was more strongly affected by butyrate than the PGE₂ protein level in most of the analyzed patients. However, in normal tissue, four of eight donors showed a tendential relation between *COX-2* gene and PGE₂ protein expression data. A comparable correlation was also found in the tumor tissue (63%).

In contrast, OPN protein levels were much more difficult to detect since the kit used was not as sensitive as the PGE₂ enzyme immunoassay. OPN derived from colon tumor samples ranged from 700 to almost 3000 pg/ml. In the cell culture supernatants of normal tissues, the glycosylated phosphoprotein was entirely below the detection limit. After OPN levels had been normalized to the total protein content of the tissue, no general expression pattern was obvious after the treatment with butyrate (Figure 5A). Half of the patients showed a reduced OPN abundance, whereas the rest exhibited increased or unaltered levels. A correlation analysis according to Spearman revealed no relation between *OPN* mRNA and protein. Only four of eight patients showed an approximate conformity with the respective gene expression (Figure 5B). In contrast to COX-2, a divergent relation regarding the butyrate effect and age of donors is assumed. Younger patients showed stronger decreased mRNA levels in relation to their protein expression in tumor tissue after butyrate treatment. This effect is probably diminished or even inverted with ongoing age of patients indicating a different posttranscriptional mechanism as those regulating *COX-2* mRNA expression ($r = -0.67$, $P = 0.18$).

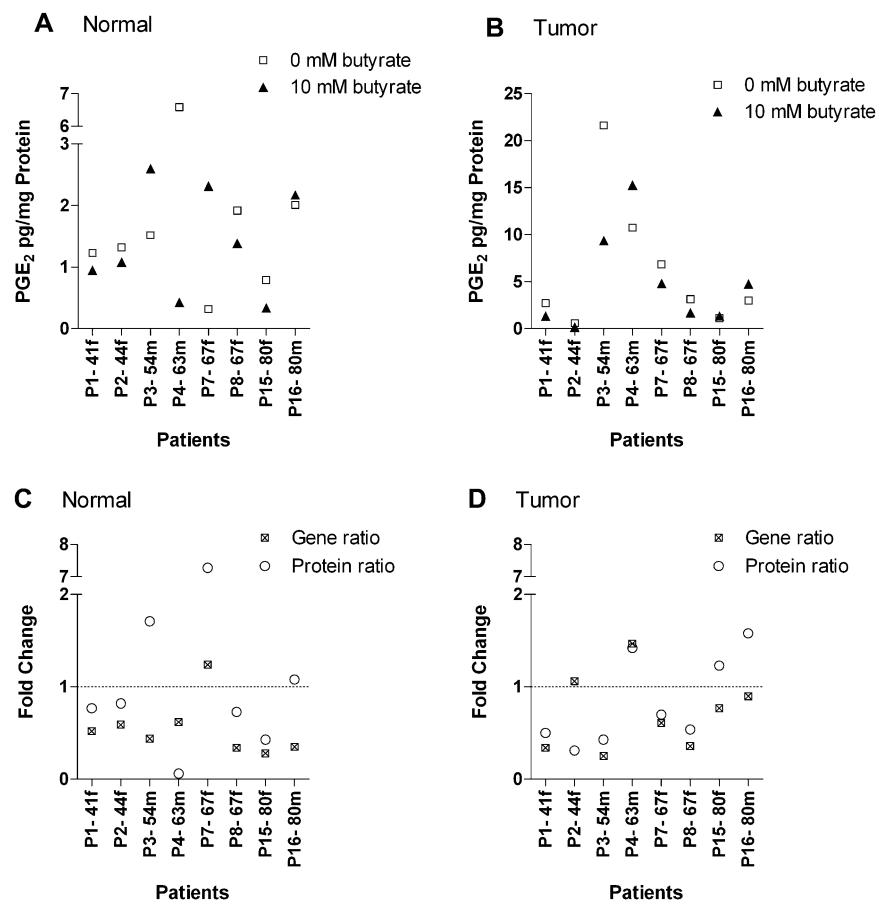


Fig. 4. Effect of butyrate on PGE₂ levels derived from normal (A) and tumor colon tissue (B) of individual patients ($n = 8$). PGE₂ concentrations were determined in cell culture supernatants of butyrate-treated (10 mM, 12 h) and non-treated tissues (0 mM, 12 h) by enzyme immunoassay. A comparison of PGE₂ protein and the respective *COX-2* mRNA expression after butyrate treatment is illustrated in (C) (normal) and (D) (tumor). Both parameters, expressed as ratios in relation to the corresponding controls (fold change), were not correlating according to the performed Spearman test. In all graphs, data are plotted according to age of the patients (P) in ascending order, the small letter discriminates further between male (m) and female (f).

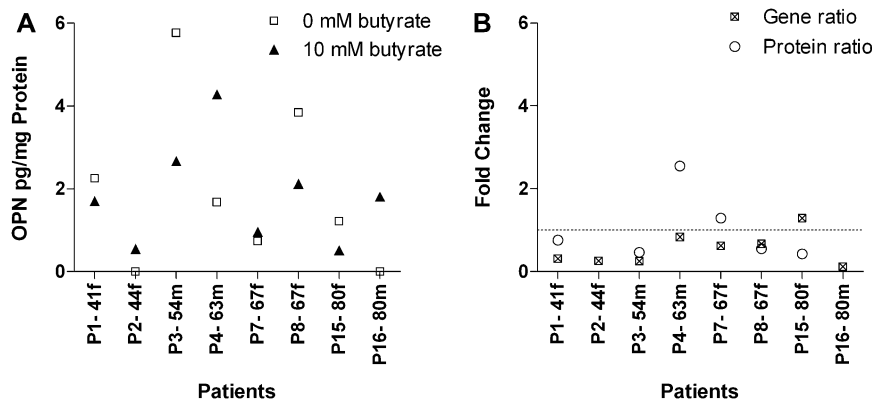


Fig. 5. Effect of butyrate on tumor-derived OPN levels (A) in individual patients ($n = 8$). OPN concentrations were determined in cell culture media of butyrate-treated (10 mM, 12 h) and non-treated (0 mM, 12 h) tissues by enzyme immunoassay. In cell culture supernatants of adjacent normal tissues, OPN was below the detection limit. Additionally, no tumor-derived OPN was found in cell culture supernatants of patient 2 and 16. A comparison (B) of OPN protein and the respective mRNA revealed no relation according to the performed Spearman test. Data are arranged by age of the patients (P) in ascending order, the small letter indicates further males (m) and females (f).

Discussion

Basal expression levels

The overexpression of *OPN* and *COX-2* mRNA observed in colon cancer is in line with previous results (11,25), but a marked increase of both genes and/or their respective proteins during progression of malignant transformation as reported by Agrawal *et al.* (26) and Soumaoro *et al.* (17) who concentrated only on basal expression levels was not found. The relative small number of donors used in this study and the unequal distribution of tumor stages can probably be attributed to the missing correlation between expression of *OPN* or *COX-2* mRNA and tumor stages.

Besides clinical parameters, promoter polymorphisms (27), taking of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (e.g. aspirin) (28) or specific eating habits (29) may account for the interindividual differences of *COX-2* expression in normal as well as in transformed tissue. A reported promoter polymorphism (30) and mutated ras (31) or p53 (32) proteins might be explain the different expression levels of *OPN*.

Influence of culturing on expression levels

After resection of colon tissue, an acute stress situation is occurring up to the end of the experiment. *OPN* and *COX-2* mRNA were dramatically increased during culturing of the epithelial tissue strips in medium, with highest expression alterations in normal tissues. In the literature, *OPN* expression is reported to be frequently upregulated in response to various stressors (33). Thereby, the protein acts as a survival factor protecting cells from undergoing apoptosis via distinct pathways (34). Single components of the cell culture medium may enhance *COX-2* and *OPN* expression in addition. Fetal calf serum is most probably the major inducing supplement (35,36) complemented by others (37–39). In consideration of the exogenous circumstances and medium composition, we suppose a synergistic effect leading to the increase of *OPN* and *COX-2* mRNA. Therefore, assessment of the butyrate effects requires the comparison with a medium control.

Influence of butyrate on expression levels

Adding a physiological relevant dose of butyrate (10 mM) (40) inhibited the medium-induced *OPN* mRNA expression in tumor colon tissue dependent on the initial transcript amount. A similar suppression had been observed in adenoma and normal tissue with varying sensitivity to butyrate. However, these modifications did not correlate with the respective protein expression of *OPN* ($r = -0.03$). A previous study which indeed detected opposite effects of butyrate on *OPN* had been shown a similar variation between *OPN* gene (20-fold

increase) and protein expression (3-fold increase) in MCE301 mouse colonic epithelial cells after 48 h butyrate (2 mM) treatment (41). Based on these results and our own, we hypothesize a time lag between transcription and translation or translation and posttranslational modifications, respectively. To definitely confirm or exclude this, kinetic studies of *OPN* at all expression levels have to be performed, prospectively. *OPN* is activated at the transcriptional level by several signaling pathways and transcription factors that are associated with cancer progression (14). Furthermore, the protein is extensively regulated at the posttranslational level by phosphorylation and *O*-glycosylation (42). These modifications are cell type specific and crucial for the biological activity of *OPN* (43).

Besides regulatory mechanisms, it also should be considered that different pieces of the same tissue were used for the various analyses, as observed in other studies. Due to the heterogeneity of tumors, it might be that different areas show variable effects to butyrate. This fact is especially interesting in the case of *OPN* since the protein which is equally produced by tumor cells and immune cells performs apparently divergent functions depending on the cell type (44).

A further aspect that should be considered when interpreting the results is the cleavage of *OPN* protein by thrombin under specific physiological circumstances *in vivo* (e.g. tissue injury or inflammation). Since we have to assume that a certain part of *OPN* has been cleaved without false sample handling, this part would not be detected from our and most other offered kits that measure only uncleaved *OPN* (45). Cleavage of full-length *OPN* plays apparently an important role in the regulation of *OPN* function (46) and hence should not be left unconsidered.

The underlying mechanism by which butyrate is modifying *OPN* gene expression is still obscure. But, a recently published study by Sharma *et al.* (47) provided new insights into the potential features of histone deacetylase (HDAC) inhibitors regarding the experimentally induced *OPN* transcription which is associated with HDAC1. Since butyrate as a known HDAC inhibitor has been reported to inhibit HDAC1 activity in HeLa cancer cells, we assume a downregulation of *OPN* gene expression by its HDAC inhibitory activity. Nevertheless, the precise mechanism of action has to be elucidated in further experiments.

Moreover, in agreement with other *in vitro* studies (48), we observed a suppression of *COX-2* (mRNA) expression through butyrate with significant outcome in colon tumor tissue. In normal colon mucosa, an inhibitory effect of butyrate was found with rising number of *COX-2* transcripts that indirectly confirms the anti-inflammatory potential of the SCFA. The effects of butyrate at the expression levels of *COX-2* as well as *OPN* mRNA in normal colon epithelium were similar to those in tumor tissue which is probably attributable to the altered metabolic phenotype of colon mucosa, seeming histologically

normal (49). It should be kept in mind that this phenotype does not correspond to that of healthy volunteers anymore when working with these tissue specimens.

Some discordance appeared when relating the expression of mRNA to COX-2 protein synthesis and PGE₂ production. Only 4 of 12 normal and tumor tissues in total showed relative consistent mRNA and protein amounts. In contrast to our study, others have observed simultaneous changes after previous cytokine stimulation (48) of colon cancer cell lines, affecting all expression levels. Since we measured all parameters solely after 12 h, we cannot definitely rule out the possibility that there was insufficient time for the reduced mRNA levels to translate into reduced levels of protein and enzyme expression, respectively. To exclude or prove a time lag between transcription and translation, protein expression should also be investigated at a subsequent date, prospectively. This will be possible by further improving our primary cell culture where to date the maximum duration for culturing is 12 h. Additionally, the presence of serum in the cell culture medium might interfere with the regulation of COX-2 (50) and possibly accounts for the ambiguity. Therefore, caution should be taken when interpreting these results.

Alternatively, it has to be considered that COX-2 can be regulated at several levels, including transcription, mRNA stability and mRNA translation. Butyrate has been reported to inhibit the transcription elongation step but not transcription initiation or mRNA stability via the 3'-untranslated region (51). In colon cells, transcriptional and posttranscriptional control of COX-2 gene expression is hypothesized as a possible decisive checkpoint, if deregulated leading to the constitutive overexpression of the protein as detected in cancer cells (52). Besides a direct action, the complex regulation of COX-2 offers also the possibility to target alternative pathways/mechanisms, which may finally modulate COX-2 functions. Butyrate has further been shown, for example, to modulate inflammatory mediators, such as nuclear factor-kappaB or tumor necrosis factor- α (53) and mitogen-activated protein kinases (54), which are involved in the transcriptional activation of COX-2 and trigger its expression in the early phases of carcinogenesis. Based on these facts and our results, we conclude that COX-2 might be prior targeted by butyrate in inflammatory processes and in the pre-stages of cancer that are associated with loss of transcriptional control of COX-2. With progression of tumor development, the effectiveness of butyrate to inhibit COX-2 expression seemingly decreases due to a predominantly posttranscriptional regulation of the gene (increase of mRNA stability) in the later stages of cancer (52). Even if the impact of the SCFA on COX-2 might be limited and thus its use to specific lesions, we do not generally doubt the effectiveness of butyrate as an anticancer/anti-inflammatory agent since a variety of other proteins/pathways which are dysregulated in colon cancer, rank among butyrate's targets.

Besides COX-2, the production of PGE₂ is further regulated by the complex interaction of phospholipase A₂, microsomal prostaglandin E synthase and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. All downstream enzymes in the COX pathway were found either up- or downregulated in colorectal cancer and represent additional targets for decreasing the level of PGE₂ (55–57). The activities of these enzymes have been observed to be functionally coupled and inducible by inflammatory cytokines (58,59). In agreement with Pugh and Thomas (60), who demonstrated increased levels of PGE₂ in colonic polyps and adenocarcinomas, we detected a higher PGE₂ release by tumors in the media when comparing with normal mucosa after *in vitro* culturing. Supplementation of the medium with butyrate was followed only by a minor insignificant decrease of PGE₂ levels in normal as well as in transformed tissues. Similar observations were also made by other groups.

To explain the lack of correlation between COX-2 mRNA levels and PGE₂ synthesis, biological factors (heterogeneity of the tumor, complex regulation of PGE₂) and the experimental design of the study have to be considered. A study of Sherratt *et al.* (61) indicated that no generalized co-regulation of COX-2 and microsomal prostaglandin E synthase is existing despite the functional coupling of both genes. Depending on the chemopreventive agent, COX-2 and microsomal prostaglandin E synthase can be differentially regulated resulting in

opposed effects at the level of COX-2 mRNA expression and PGE₂ production. In contrast, a positive correlation between the protein expression levels of COX-2 and phospholipase A₂ was found in colon carcinomas (56), supposing a co-regulation. The missing stimulation of colon tissues by arachidonic acid (AA) provides an additional possibility that might explain the missing correlation between the abundance of COX-2 mRNA and PGE₂. To ensure the availability of free AA, exogenous AA is added in many experimental approaches. The experimental design that we have chosen did not allow the supply of AA since the tissue material was limited and therefore also used for analysis of further targets. AA is essential for the production of PGE₂ and can induce phospholipase A₂ as well as COX-2 that is accompanied by an increased level of PGE₂ (62). Alternatively, serum has also been reported to have a stimulative effect on PGE₂ production (58). Even if this stimulus is probably too low to release sufficient amounts of AA, it is more likely that the minor impact of butyrate is due to the marginal effects observed at the protein expression level of COX-2 since the inflammatory enzyme catalyzes the rate-limiting step in prostaglandin biosynthesis.

In summary, for the first time, the present study shows the butyrate-initiated decrease of OPN and COX-2 mRNA in human colon tissues with different degree of transformation derived from individual donors. In this regard, only a few cell line studies exist so far, postulating occasionally contrary effects of butyrate. However, at the functional level, only minor insignificant reductions of OPN and PGE₂ levels appeared in this study. Based on these results, the use of butyrate as a single anticancer drug seems to be limited and further investigations are needed to define its impact on the synthesis of OPN and PGE₂ which are crucial for the development of colon cancer.

Funding

German Research Foundation (PO 284/8-2).

Acknowledgements

We thank Kerstin Kalmring-Raspe, Dr Wiebke Schlörmann, Birgit Reumann and Rosalie Ridzewski for technical assistance and their helpful encouragement. Additionally, we express our gratitude to Christine Drake who edited the language of the manuscript.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Ferlay, J. *et al.* (2010) *Globocan 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. <http://globocan.iarc.fr>. (08 February 2011, date last accessed).
2. Bingham, S.A. *et al.* (2003) Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, **361**, 1496–1501.
3. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. (2007) *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. American Institute for Cancer Research, Washington, DC.
4. Beyer-Schlmeyer, G. *et al.* (2003) Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br. J. Nutr.*, **90**, 1057–1070.
5. Pool-Zobel, B.L. *et al.* (2005) Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis*, **26**, 1064–1076.
6. Scharlau, D. *et al.* (2009) Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat. Res.* **682**, 39–53.
7. Gibson, P.R. *et al.* (1999) Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis*, **20**, 539–544.
8. Oshima, M. *et al.* (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, **87**, 803–809.

9. Wai,P.Y. *et al.* (2005) Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis*, **26**, 741–751.
10. Mazzali,M. *et al.* (2002) Osteopontin—a molecule for all seasons. *QJM*, **95**, 3–13.
11. Fedarko,N.S. *et al.* (2001) Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 4060–4066.
12. Rohde,F. *et al.* (2007) Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int. J. Cancer*, **121**, 1717–1723.
13. McAllister,S.S. *et al.* (2008) Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell*, **133**, 994–1005.
14. Wai,P.Y. *et al.* (2008) Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **27**, 103–118.
15. Funk,C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, **294**, 1871–1875.
16. McLean,M.H. *et al.* (2008) COX-2 expression in sporadic colorectal adenomatous polyps is linked to adenoma characteristics. *Histopathology*, **52**, 806–815.
17. Soumaoro,L.T. *et al.* (2004) Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8465–8471.
18. Greenhough,A. *et al.* (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, **30**, 377–386.
19. Lev-Ari,S. *et al.* (2005) Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 6738–6744.
20. Zhao,J. *et al.* (2008) Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. *Gastroenterology*, **135**, 956–968.
21. Schaeferhenrich,A. *et al.* (2003) Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 655–664.
22. Rogler,G. *et al.* (1998) Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab. Invest.*, **78**, 889–890.
23. Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.
24. Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
25. Kargman,S.L. *et al.* (1995) Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.*, **55**, 2556–2559.
26. Agrawal,D. *et al.* (2002) Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J. Natl Cancer Inst.*, **94**, 513–521.
27. Papafili,A. *et al.* (2002) Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1631–1636.
28. Zhang,Z.H. *et al.* (2004) Targeting cyclooxygenase-2 with sodium butyrate and NSAIDs on colorectal adenoma/carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.*, **10**, 2954–2957.
29. Pajari,A.M. *et al.* (1998) Role of red meat and arachidonic acid in protein kinase C activation in rat colonic mucosa. *Nutr. Cancer*, **32**, 86–94.
30. Schultz,J. *et al.* (2009) The functional -443T/C osteopontin promoter polymorphism influences osteopontin gene expression in melanoma cells via binding of c-Myb transcription factor. *Mol. Carcinog.*, **48**, 14–23.
31. Chambers,A.F. *et al.* (1992) Induction of expression of osteopontin (OPN; secreted phosphoprotein) in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Anticancer Res.*, **12**, 43–47.
32. Morimoto,I. *et al.* (2002) Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 270–278.
33. Wang,K.X. *et al.* (2008) Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **19**, 333–345.
34. Courter,D. *et al.* (2010) The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways. *PLoS One*, **5**, e9633.
35. Lee,S.H. *et al.* (1992) Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25934–25938.
36. Nagasaki,T. *et al.* (1997) Osteopontin gene expression and protein synthesis in cultured rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 81–85.
37. Mann,J.R. *et al.* (2006) Repression of prostaglandin dehydrogenase by epidermal growth factor and snail increases prostaglandin E2 and promotes cancer progression. *Cancer Res.*, **66**, 6649–6656.
38. Ozaki,N. *et al.* (2010) Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats—a toxicogenomic investigation. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **62**, 555–566.
39. Takemoto,M. *et al.* (1999) Enhanced expression of osteopontin by high glucose in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 722–726.
40. Hamer,H.M. *et al.* (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **27**, 104–119.
41. Tabuchi,Y. *et al.* (2002) Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1287–1294.
42. Christensen,B. *et al.* (2005) Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem. J.*, **390**, 285–292.
43. Christensen,B. *et al.* (2007) Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J. Biol. Chem.*, **282**, 19463–19472.
44. Crawford,H.C. *et al.* (1998) Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression *in vivo*. *Cancer Res.*, **58**, 5206–5215.
45. Anborgh,P.H. *et al.* (2009) New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer: clinical validation and comparison of multiple ELISAs. *Clin. Chem.*, **55**, 895–903.
46. Senger,D.R. *et al.* (1994) Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 565–574.
47. Sharma,P. *et al.* (2010) Transcriptional regulation of human osteopontin promoter by histone deacetylase inhibitor, trichostatin A in cervical cancer cells. *Mol. Cancer*, **9**, 178.
48. Tong,X. *et al.* (2004) Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 463–471.
49. Chen,L.C. *et al.* (2004) Alteration of gene expression in normal-appearing colon mucosa of APC(min) mice and human cancer patients. *Cancer Res.*, **64**, 3694–3700.
50. DeWitt,D.L. *et al.* (1993) Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **306**, 94–102.
51. Tong,X. *et al.* (2005) Cyclooxygenase-2 regulation in colon cancer cells: modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15503–15509.
52. Dixon,D.A. (2003) Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog. Exp. Tumor Res.*, **37**, 52–71.
53. Usami,M. *et al.* (2008) Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr. Res.*, **28**, 321–328.
54. Jung,J.W. *et al.* (2005) Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate. *Cancer Lett.*, **225**, 199–206.
55. Backlund,M.G. *et al.* (2005) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J. Biol. Chem.*, **280**, 3217–3223.
56. Panel,V. *et al.* (2006) Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production. *Cancer Lett.*, **243**, 255–263.
57. Seo,T. *et al.* (2009) Microsomal prostaglandin E synthase protein levels correlate with prognosis in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.*, **454**, 667–676.
58. Murakami,M. *et al.* (1999) Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3103–3115.
59. Murakami,M. *et al.* (2000) Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **275**, 32783–32792.
60. Pugh,S. *et al.* (1994) Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut*, **35**, 675–678.
61. Sherratt,P.J. *et al.* (2003) Positive and negative regulation of prostaglandin E2 biosynthesis in human colorectal carcinoma cells by cancer chemopreventive agents. *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 51–61.
62. Hughes-Fulford,M. *et al.* (2005) Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A2 in prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **26**, 1520–1526.

Received January 10, 2011; revised March 8, 2011;
accepted March 25, 2011

2.3 Publikation III: Impact of butyrate on PKM2 and HSP90 β in human colon tissues of different transformation stages: a comparison of gene and protein data. Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Karl Otto Greulich, Mariya Radeva, Anja Wölfert, Michael Glei. *Genes & Nutrition*, 2012; 7(2):235-46.

Pyruvatkinase M2 (PKM2) und Hitzeschockprotein 90 β (HSP90 β) spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus und beim Wachstum von Tumoren. Die vorliegende Studie sollte den Einfluss des antikanzerogenen Darmfermentationsproduktes Butyrat auf die Expression beider Tumormarker in humanem Kolongewebe untersuchen. Dazu wurde gepaartes Normal-, Adenom- und Tumorgewebe von insgesamt 20 Patienten mit einem diagnostizierten Kolorektalkarzinom verwendet. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (quantitative Real-time PCR) zeigten einen moderaten Anstieg der mRNA-Gehalte von *PKM2* und *HSP90 β* in Kolonadenomen und -tumoren im Vergleich zu normalem Gewebe, der jedoch keinen Bezug zu klinischen Parametern hatte. Für PKM2 ließ sich auf Proteinebene (Western Blot) im Median ein ähnliches Expressionsmuster feststellen. Die Inkubation mit Butyrat *ex vivo* führte zu einer Abnahme der *PKM2*-Transkriptmenge in allen drei Gewebetypen. Die stärkste Reduktion wurde dabei in Kolontumoren beobachtet (median 45 %). Auf Proteinebene hat sich dieser Einfluss bisher jedoch nicht gezeigt. Im Unterschied zum glykolytischen Enzym blieb die Expression des HSP90 β durch die kurzkettige Fettsäure in allen Gewebetypen nahezu unverändert mit Ausnahme des normalen Gewebes. Dort konnte eine Zunahme der *HSP90 β* mRNA-Menge (median 1,4-fach) verzeichnet werden. Obwohl im Tumorgewebe keine signifikante Veränderung der HSP90 β -Expression feststellbar war, konnte eine Korrelation der individuellen Gen- und Proteinexpressionsveränderungen nach Butyrat-Applikation identifiziert werden. Nachfolgende Untersuchungen müssen nun klären, ob *PKM2* tatsächlich zu den Zielproteinen der chemopräventiven Aktivität von Butyrat zählt.

Eigenanteil:

- Aufarbeitung und Inkubation der Kolongewebeproben mit Butyrat
- RNA-Isolierung und Genexpressionsanalyse (Real-time PCR)
- Zytosolextraktion, Proteinbestimmung und Proteinexpressionsuntersuchungen (Western Blot)
- Auswertung, Darstellung und Interpretation der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskripts

Impact of butyrate on PKM2 and HSP90 β expression in human colon tissues of different transformation stages: a comparison of gene and protein data

Franziska Jahns · Anne Wilhelm · Karl Otto Greulich ·
Henning Mothes · Mariya Radeva ·
Anja Wölfert · Michael Glei

Received: 13 July 2011 / Accepted: 30 September 2011 / Published online: 19 October 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Due to protection of oncogenic proteins from degradation and enhancement of glycolytic phosphometabolites for synthetic processes, respectively, heat shock protein 90 (HSP90) and pyruvate kinase type M2 (PKM2) are important proteins for tumor growth. The present study was undertaken to investigate the susceptibility of both proteins and their encoding genes to the chemopreventive agent butyrate in human colon cells. Matched tissue of different transformation stages derived from 20 individual colon cancer patients was used for the experiments. The results of quantitative real-time PCR revealed a moderate increase of HSP90 β and PKM2 mRNA in colon tumors ($P < 0.01$) compared to normal tissues without relation to clinical parameters. The expression pattern could be confirmed for PKM2 protein by Western blot but not for HSP90 β . During culturing with butyrate, the amount of PKM2 transcripts decreased in all three tissue types with the strongest effects observed in tumors (median fold decrease 45%, $P < 0.05$). The protein data have not

reflected this influence supposing a more gradual degradation rate due to a longer half-life of PKM2. In contrast, the mRNA expression of HSP90 β in normal tissue was found 1.38-fold increased by butyrate ($P < 0.05$), but not the corresponding protein level. HSP90 β expression in adenomas and tumors remained generally insensitive. Only in malignant tissue, however, a significant correlation was found between the individual effects observed on gene and protein expression level. In conclusion, the present study identified PKM2 as a potential direct target of butyrate in neoplastic colon tissue, whereas HSP90 β is none of it.

Keywords PKM2 · HSP90 · Butyrate · Colon cancer · Dietary fiber · Chemoprevention

Abbreviations

PKM2	Pyruvate kinase type M2
HSP90 β	Heat shock protein 90 beta
SCFA	Short chain fatty acids
HBSS	Hank's balanced salt solution
mRNA	Messenger RNA
cDNA	Complementary DNA
qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
GUS	β -glucuronidase
HDAC	Histone deacetylase

F. Jahns (✉) · A. Wilhelm · M. Glei
Department of Nutritional Toxicology, Institute of Nutrition,
Friedrich-Schiller-University Jena, Jena, Germany
e-mail: franziskajahns@aol.com

F. Jahns · A. Wilhelm · K. O. Greulich · M. Radeva
Department of Single Cell and Single Molecule Techniques,
Leibniz Institute of Age Research-Fritz Lipmann Institute,
Jena, Germany

H. Mothes
Department of General, Visceral and Vascular Surgery,
University Hospital, Friedrich-Schiller-University Jena,
Jena, Germany

A. Wölfert
Institute of Pathology, Friedrich-Schiller-University Jena,
Jena, Germany

Introduction

Heat shock protein 90 (HSP90) and pyruvate kinase type M2 (PKM2) are essential for tumor growth and cancer metabolism and therefore, represent promising targets in the treatment of cancer (Christofk et al. 2008a; Neckers

2007). HSP90 works as a molecular chaperone required physiologically for the maintenance and function of a wide range of proteins as well as mutated and aberrantly expressed proteins in cancer cells (Neckers 2007). These include transcription factors, protein kinases, and a large number of structurally unrelated proteins (e.g., steroid hormone receptors, Bcr-Abl, c-src, ErbB2, p53, cyclin-dependent kinases, telomerase, Akt, HIF-1 α) (Pearl et al. 2008; Picard 2011). Stabilization of these client proteins that are often overexpressed in tumors prevents their degradation by the proteasome and consequently contributes to tumor development and cell survival (Brown et al. 2007). Blocking of HSP90 was shown to result in reduced invasiveness in vitro and in decreased tumor cell proliferation, vascularization as well as an improved efficacy of conventional therapy strategies in vivo (Moser et al. 2007). Further, HSP90 expressed by cancer cells protects against apoptosis (Rashmi et al. 2003), down-regulates tumor-suppressing signals such as TP53 (Lin et al. 2008) and enables replicative immortality through enhanced telomerase assembly (Akalın et al. 2001). HSP90 function is thereby implicated in the establishment of each of the hallmarks of cancer (Neckers 2007) that were first proposed and recently extended by Hanahan and Weinberg (2011). In addition to its client proteins, HSP90 itself was overexpressed in a variety of tumors, e.g., skin (Becker et al. 2004), prostate (Elmore et al. 2008), breast (Diehl et al. 2009), and colon (Milicevic et al. 2008). The function of HSP90 in tumorigenesis led to considerable interest in the chaperone as a target in cancer therapy. Inhibition of HSP90 is associated with the potential of down-regulating multiple oncogenic signaling pathways in which the various client proteins of HSP90 are involved. Classical inhibitors like geldanamycin and its derivatives as well as synthetic molecules block the ATPase-coupled chaperone cycle and consign bound client proteins for ubiquitination and proteosomal degradation (Pearl et al. 2008). Targeting molecules that are involved in the regulation of HSP90, as for example histone deacetylase (HDAC) 6, is an alternative approach to inhibit chaperone activity (Pearl et al. 2008) and was, inter alia, demonstrated for genistein (Basak et al. 2008). Quercetin (Aalınkeel et al. 2008) and epigallocatechin-3-gallate (Yin et al. 2009) are further nutrition-related compounds with HSP90-inhibiting potential.

Besides deregulated control of cell proliferation, reprogramming of energy metabolism is essential for tumor growth and considered as an emerging hallmark of cancer cells (Hanahan and Weinberg 2011). Genes of glycolysis are involved in this adjustment, whereas PKM2 plays a key role. The enzyme represents one of 4 pyruvate kinase isoforms catalyzing the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate during glycolysis. The isoform is typical

for proliferating cells, such as in fetal and adult tissues, and for tumor cells. Malignant tissues express predominantly a dimeric, inactive form of PKM2 that is induced by direct interaction with oncoproteins or phosphotyrosine binding (Christofk et al. 2008b; Mazurek et al. 2005; Zwerschke et al. 1999). Catalytic inactive PKM2 is necessary for the metabolic switch from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis and proliferation of cells (Christofk et al. 2008b; Hitosugi et al. 2009). Attenuated PKM2 activity leads to increased lactate production and reduced oxygen consumption (Christofk et al. 2008a) that are typical features of the cancer cell's metabolism. Consequently, proliferation of tumor cells is promoted by a temporary accumulation of upstream phosphometabolites. These are becoming available as precursors for anabolic processes, such as DNA, amino acid, and phospholipid synthesis (Christofk et al. 2008b; Mazurek et al. 2005). Its involvement in carcinogenesis marks PKM2 as a target for the development and/or identification of novel cancer-related drugs as well. An inhibition of PKM2 has been shown to be accompanied by decelerated tumor cell proliferation and induced apoptosis as demonstrated by Spoden et al. (2008) and Guo et al. (2011) using specific PKM2 aptamers and RNA interference, respectively. So far, only indirect evidence is given regarding a regulation by bioactive food agents (Kim and Milner 2011). Components like luteolin (Byun et al. 2010), delphinidin (Fridrich et al. 2008), or butyrate (Hirsch et al. 2006) were reported to inhibit oncogenic tyrosine kinases that are known to participate in the regulation of PKM2 activity (Hitosugi et al. 2009).

The short chain fatty acid (SCFA) butyrate results, along with other products, from the colonic fermentation of dietary fibers (soluble) which belong to the most studied food ingredients in relation to colon cancer chemoprevention and are associated with a reduced risk for the disease (Bingham et al. 2003; Scharlau et al. 2009; Wong et al. 2006). Among the most abundant SCFA, butyrate represents about 20% and reaches absolute concentrations of 11–25 mM in human feces, whereas concentrations in peripheral venous blood are even lower (Hamer et al. 2008; Wolever and Chiasson 2000). Compared to acetate or propionate, the C₄ carbonic acid is best characterized and linked to numerous anti-cancer effects in vitro and in vivo, e.g., induction of apoptosis, inhibition of proliferation, and modulation of various gene families (Borowicki et al. 2011; Pool-Zobel et al. 2005; Zhang et al. 2010). Therefore, the present study focused on butyrate and its impact on gene expression of HSP90 β and PKM2 as well as their analog proteins in malignant and non-malignant (normal and adenoma) colon tissues derived from individual donors. Among the different types of tissue, adenoma is most interesting to study but difficult to obtain. Most tumors arise from these benign lesions, although only a small percentage of adenomas is

going to progress to malignancy (Peipins and Sandler 1994). Among the 4 members of the HSP90 family, HSP90 β was focused due to its overexpression in colon cancer as shown in own previous experiments (Radeva 2009). The outcomes of the study shall extend the few available data regarding the butyrate sensitivity of HSP90 and PKM2 and maybe identify a novel natural agent inhibiting both tumor markers.

Materials and methods

Tissue specimens

Colon tumor tissue and adjacent normal-appearing tissue were consecutively and unselectively obtained at the time of surgery from 20 patients undergoing colon surgical resection on schedule at the University Hospital of Jena. Normal colon samples were removed at a distance of 20–50 cm from the tumor site. Five out of the 20 patients had an additional or sole adenoma which was discovered accidentally during surgery and also included in the investigations. Eight men and twelve women aged between 41 and 92 years attended the study. None of them has received chemotherapy or radiation prior to surgery. All tissue samples were checked and classified during histopathological examination by an experienced pathologist (Table 1). Normal tissues showed no signs of malignancy and inflammation and adenoma samples were proven to be benign. The tissue samples were stored in Hank's balanced salt solution (HBSS; 8.0 g/l NaCl; 0.4 g/l KCl; 0.06 g/l Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 0.06 g/l K₂HPO₄; 1 g/l glucose; 0.35 g/l NaHCO₃; 4.8 g/l HEPES; pH 7.2) on ice and prepared immediately as previously reported (Jahns et al. 2011). The resulting tissue strips of normal, adenoma, and tumor samples were either frozen in liquid nitrogen alone or submerged in RNA *later* (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at –80°C until cytosol or RNA was being extracted.

Treatment of colon tissue with butyrate

Simultaneously, strips from all 3 tissue types were randomly distributed to different wells which were used for the various experiments later on. Treatment with the same batch of an intestinally relevant dose of butyrate (10 mM) (Hamer et al. 2008) for 12 h was performed in parallel, subsequently (Jahns et al. 2011). Primary cell culture medium (solvent for butyrate) was used as a control in the experiments and consisted of minimal essential medium with Earle's salts enriched with 20% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 µg/ml gentamycin, 2.5 µg/ml fungizone, 10 ng/ml epidermal growth factor, 5 µg/ml insulin,

5 µg/ml transferrin, and 5 ng/ml sodium selenite according to Rogler et al. (1998). After 12-h incubation, the tissue strips used for protein analyses were washed in HBSS and frozen in liquid nitrogen. Samples for gene expression studies were additionally submerged in RNA *later*. Storage occurred equivalent to the other tissue specimens. According to Sauer et al. (2007), 12 h was the maximum duration of treatment for primary colon tissue to get enough viable cells and intact RNA.

Isolation of RNA and reverse transcription into complementary DNA (cDNA)

RNA isolation and cDNA synthesis were performed as previously described (Jahns et al. 2011). In short, total RNA was isolated from the homogenized tissue samples by using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol followed by spectrophotometrically quantification with the NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Integrity of the RNA was determined with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Only RNA of sufficient quality (RNA integrity number >5) (Fleige et al. 2006) was reverse transcribed using the SuperScript II First Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Due to variation of quantity of extracted total RNA, the amount used as a template varied with each patient from 100 to 2,500 ng.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Quantitative PCR conditions were already described by Jahns et al. (2011). Briefly, 2 µl cDNA prepared from different starting concentrations of total RNA were amplified in three steps by using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany) and 10 pmol gene-specific primers: HSP90 β forward, 5'-CGTTGCTCACTATTACG TATAATCCT-3' and reverse, 5'-CGAATCTTGTCCAAG GCATC-3'; PKM2 forward, 5'-TCCGGATCTCTTCGTC TTTG-3' and reverse, 5'-TGGGTCTGAATGAAGGCA GT-3'; β -actin forward, 5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCG AT-3' and reverse, 5'-CCCACGATGGAGGGGAAGAC-3'; β -glucuronidase (GUS) forward, 5'-TGCAGGTGATGGAA GAAGTG-3' and reverse, 5'-TTGCTCACAAAGGTCACA GG-3'.

The expression of the targets was normalized to the geometric average (Vandesompele et al. 2002) of two reference genes (β -actin, GUS) based on the equation of Pfaffl (2001) involving efficiency (E) and quantification cycle (C_q). Since the reaction efficiencies of all primer pairs were close to 100%, E was set to 2.

Table 1 Clinicopathological data of colorectal cancer patients analyzed in this study

Patient and tumor characteristics	Number of patients
Mean age (years) \pm SD	70.5 \pm 13.2
Gender	12 females, 8 males
Tumor stage	
I	2
II	6
III	8
IV	3
Tumor grading	
1	–
2	10
3	7
4	1
Unknown	1

One of the 20 donors was only found with adenoma. Tumor stage was assessed according to the Union for International Cancer Control classification

$$\text{Relative mRNA expression} = \frac{\sqrt{EC_q(\beta\text{-actin})} \times EC_q(\text{GUS})}{EC_q(\text{target})}$$

Cytosol extraction and Western blot analysis

Butyrate-treated (10 mM) and non-treated pieces of tissue samples (normal, adenoma, and tumor) of the same set of patients that was already used for mRNA expression analysis were homogenized in cold lysis buffer (50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM Na_2EDTA ; 0.1% Triton X-100 and 1 mM Pefabloc; pH 7) with the Polytron homogenizer 2100 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) and centrifuged (16,000 g, 10 min, 4°C). Total protein contents were determined according to Bradford (1976). For Western blot analysis, 10–30 μg of total protein was diluted with 5 \times concentrated loading buffer (250 mM Tris–HCl (1 M) pH 6.8; 10% sodium dodecyl sulfate; 50% glycerol; 0.1% bromophenolblue and 0.5 M dithiothreitol), separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (stacking gel: 4%; separating gel: 12%; Bio-Rad) and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman, Florham Park, NJ). Subsequently, the membrane was blocked with 5% nonfat dried milk powder (1 h; AppliChem, Darmstadt, Germany) and incubated with the following primary and secondary antibodies: HSP90 β (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), PKM2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), β -actin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP (Dako, Hamburg, Germany), and Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG/HRP (Dako). Detection and evaluation of protein bands were performed as previously described (Jahns et al. 2011).

Statistical evaluation

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism Software 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). By using the nonparametric Wilcoxon matched pairs test or the Kruskal–Wallis test, two or multiple groups, respectively, were examined for significant differences. The correlation between two parameters was evaluated by the Spearman's rank correlation test. Gender differences were identified by the Mann–Whitney test. All results reached significance when $P < 0.05$.

Results

PKM2 and *HSP90 β* mRNA expression are moderately elevated in tumor tissues of colorectal cancer patients

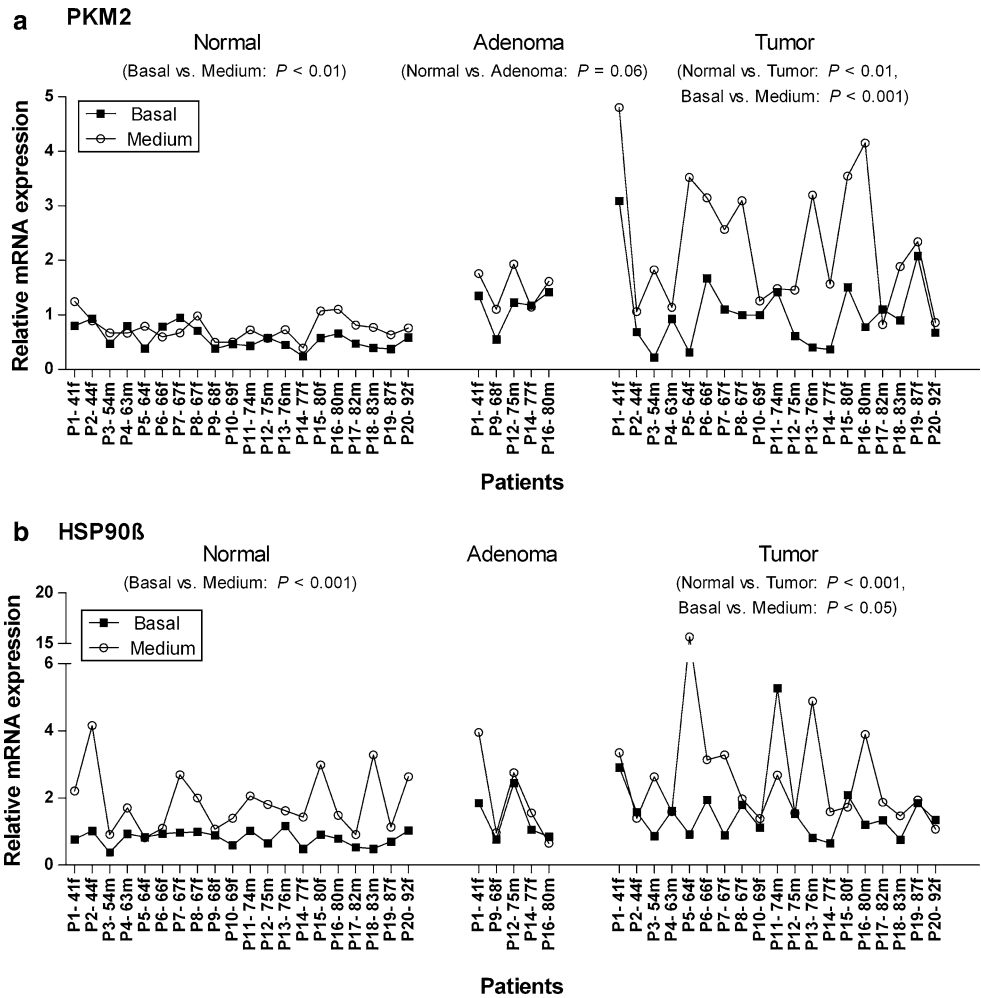
The tumor markers *PKM2* and *HSP90 β* were found to be moderately overexpressed in colon cancer tissue when compared to the related normal counterparts ($P < 0.01$, Fig. 1). *PKM2* showed a median increase of 1.41-fold (Fig. 1a), whereas *HSP90 β* was median 1.81-fold up-regulated in the malignant tissue (Fig. 1b). The adenoma samples investigated showed also enhanced mRNA levels of both genes (median fold change *PKM2* and *HSP90 β* : 2.13 and 2.14, respectively) when compared to the respective normal tissue, but only *PKM2* reached almost statistical significance ($P = 0.06$, Fig. 1).

Correlation analyses according to Spearman revealed no connection between *PKM2* or *HSP90 β* mRNA expression and clinical parameters such as tumor stage and gender (data not shown). Nevertheless, a tendency toward increased *PKM2* mRNA levels in undifferentiated colon cells (determined by the tumor grading: from G1 to G4) has been noted ($r = 0.43$, $P = 0.07$, Fig. 2a). Additionally, *PKM2* expression seems to change in colon tissue from elderly humans ($r = -0.43$, $P = 0.06$, Fig. 2b). Younger donors have been found with higher amounts of *PKM2* transcripts in normal colon epithelium compared to older ones. No link between these parameters existed in tumor tissue (data not shown). Transcription of *HSP90 β* was independent of tumor grade and age (data not shown).

In vitro culturing of epithelial tissue strips induces expression changes of *PKM2* and *HSP90 β* mRNA

Culturing of normal and tumor colon tissues ex vivo (12 h) by using our primary cell culture medium significantly augmented *PKM2* and *HSP90 β* mRNA expression (Fig. 1a, b). Median increases ranged from 1.49- to 2.17-fold when compared to the respective basal transcript levels. Benign adenoma samples reacted less sensitive to

Fig. 1 Basal mRNA expression of *PKM2* (a) and *HSP90β* (b) and its alteration after cell culturing in paired normal, adenoma, and tumor colon tissues. mRNA levels were quantified before (0 h, filled square minus) and after the treatment with medium (12 h, open circle minus) in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂) by using qPCR. Data are arranged by age of the patients (P). The small letter discriminates between male (m) and female (f). For better visualization, basal levels and culturing effects were each connected by a line. Twenty patients in total were investigated. Four of them were found with adenomas besides tumor and adjacent normal colon tissue and one was only discovered with adenoma and adjacent normal colon tissue



the incubation. By showing median elevations of 1.24 (*HSP90β*)- and 1.30 (*PKM2*)-fold compared to the related untreated tissue, adenoma samples remained almost unaffected ($P > 0.05$, Fig. 1a, b).

Butyrate affects *PKM2* and *HSP90β* mRNA expression differently

To assess the effects of the SCFA, the expression of the target genes ascertained in the butyrate-treated tissues had to be compared to those of the respective medium controls. In regard to *PKM2* and *HSP90β*, the tissues showed different susceptibility to butyrate.

The amount of *PKM2* transcripts was decreased by butyrate in all 3 tissue types but only the result of tumor tissue reached statistical significance (Fig. 3a). In normal tissue, *PKM2* mRNA level was predominantly slightly diminished (median fold change 0.81), whereas sensitivity to butyrate increased with advancing grade of transformation. Benign

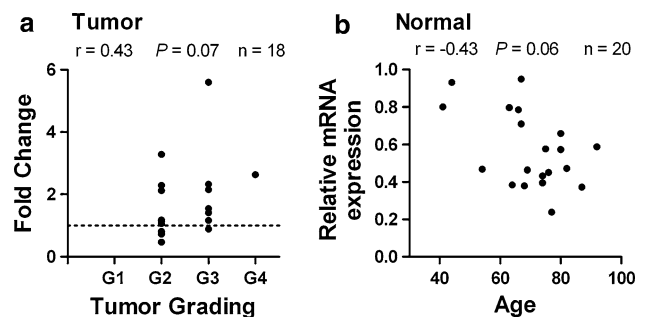


Fig. 2 Impact of clinical parameters on *PKM2* gene expression in normal and malignant colon tissue. Total RNA from paired normal, adenoma, and tumor colon tissues (filled circle) was quantified by qPCR and compared to diverse clinical data by Spearman correlation analysis. Twenty patients in total were investigated, whereby only 4 of them had all three tissue types. Trends and significant outcomes are presented. **a** In cancer tissue, an up-regulation of *PKM2* mRNA was observed with progress of dedifferentiation indicated by the tumor grading. The dotted line denotes no expression changes (fold change 1). **b** In normal colon tissue, *PKM2* mRNA expression went down with increasing age of patients

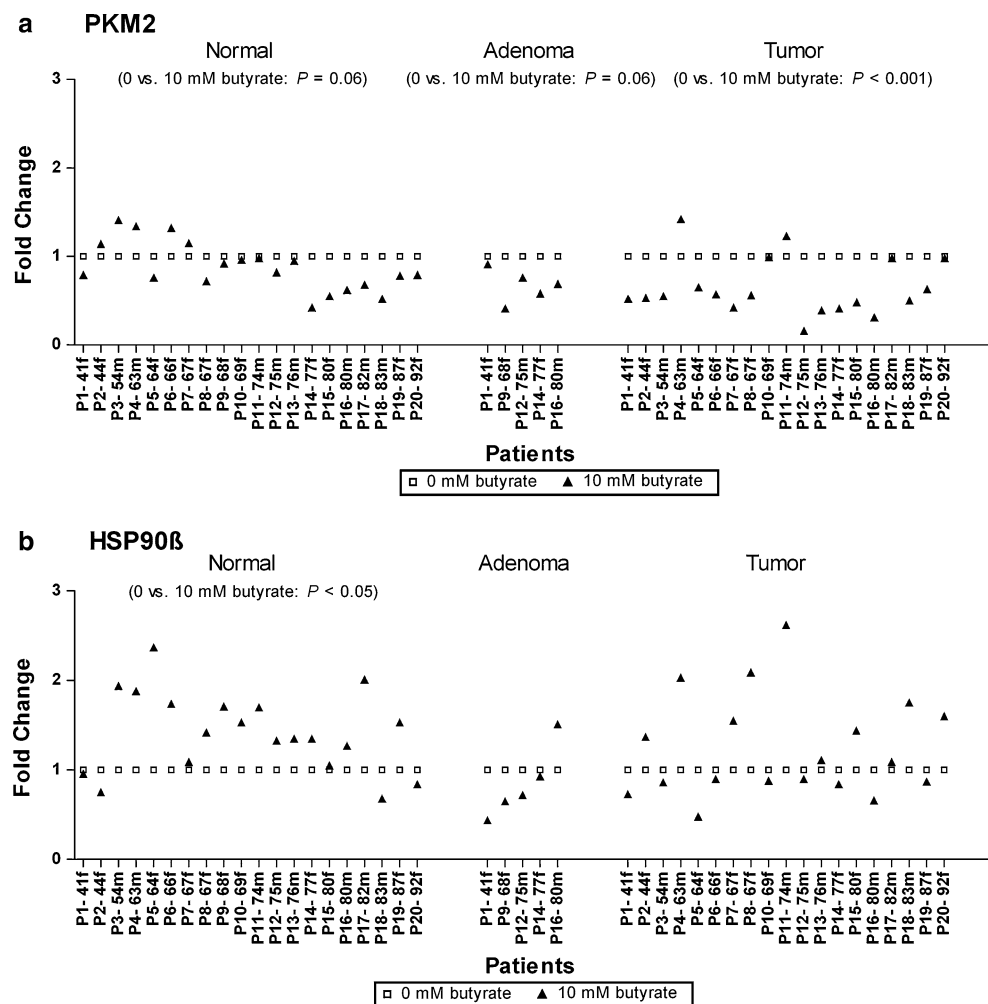
adenoma samples showed a 0.69-fold (median) reduction of *PKM2* expression when compared to the related medium controls. In the corresponding tumor tissues, butyrate was able to suppress the medium-induced *PKM2* mRNA increase by median 0.55-fold ($P < 0.001$). Fourteen out of nineteen patients possessing tumors showed a decreased transcript level of the glycolytic enzyme. Gender, age, tumor stage, or grading were not linked to the individual effect (data not shown). Besides these clinicopathological features, we tested further whether the initial *PKM2* transcript amount could be accountable for the variations in each patient. According to the Spearman correlation test, we noted by trend that *PKM2* mRNA expression was more effectively suppressed by butyrate in normal tissues showing a low basal status of *PKM2* transcripts compared to those with a high *PKM2* basal level ($r = 0.41$, $P = 0.08$, data not shown). For adenoma tissue a similar correlation is suggested, but due to the limited number of donors ($n = 5$) no statistical significance was found (data not shown). In the malignant tissue, however, modification of *PKM2* after treatment with butyrate was not linked to the respective basal mRNA level (data not shown).

Besides the effect of medium on *HSP90 β* , its supplementation with butyrate additionally enhanced the mRNA expression of the stress gene by median 1.38-fold in normal colon cells ($P < 0.05$, Fig. 3b). However, in adenoma and tumor tissue, greater interindividual variations were observed in response to the C₄ carbonic acid that reached no significant outcome (fold change adenoma and tumor: 0.72 and 1.09, respectively). Clinicopathological data (age, gender, tumor stage, and grading) or the initial transcript level did not account for the varying effects between individuals. Despite the *HSP90 β* mRNA rise in normal cells, the effect of butyrate was not significantly different from that in tumor tissue.

PKM2 and *HSP90 β* protein expression are not targeted by butyrate

For detection of *PKM2* and *HSP90 β* proteins, identical treated sample material of the patients whose mRNA expression was previously analyzed has been used. Thereby, Western blot was only performed with tissue

Fig. 3 Impact of butyrate (filled triangle) on *PKM2* (a) and *HSP90 β* (b) mRNA expression in matched normal, adenoma, and tumor colon tissues. Relative *PKM2* and *HSP90 β* mRNA levels were determined after butyrate administration (10 mM, 12 h) by qPCR and compared to the respective medium controls (open square) which were set to 1 (fold change). Results are listed by age of the patients (P), the small letter discriminates between male (m) and female (f). Twenty patients in total were investigated. Four of them had available adenomas besides tumor and adjacent normal colon tissue and one was only found with adenoma and adjacent normal colon tissue



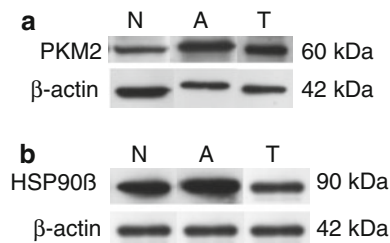


Fig. 4 Representative blots of PKM2 (a) and HSP90 β (b) basal protein expression in matched normal (N), adenoma (A), and tumor (T) colon tissue. Cytosolic extracts from all three types of tissue were analyzed by Western blot using specific antibodies. β -actin served as internal loading control

specimens of selected patients mainly showing a modified mRNA expression after butyrate treatment.

According to its basal mRNA expression, PKM2 protein was median mostly present in benign adenoma samples (2.12-fold) followed by tumor specimens (median 1.24-fold, $P < 0.05$) when compared to the related normal counterparts (data not shown except example blot, Fig. 4a). However, a patient-wise comparison of the gene and protein expression data of PKM2 demonstrated no correlation between both parameters (adenoma: $r = 0.1$, $P = 0.95$, tumor: $r = 0.30$, $P = 0.43$, data not shown).

In contrast to PKM2, HSP90 β partly showed a divergent expression pattern at the protein level as compared to its mRNA expression. In adenoma tissue, moderately elevated levels of HSP90 β (median 1.59-fold, $P = 0.125$) were detected, whereas its median expression in tumors remained almost unchanged (0.92-fold, data not shown except example blot, Fig. 4b). Again, gene and protein expression data were not congruent when comparing them in a patient-wise manner (adenoma: $r = -0.8$, $P = 0.33$, tumor: $r = -0.05$, $P = 0.88$, data not shown).

During culturing of the epithelial tissue strips the expression of PKM2 and HSP90 β protein remained relatively constant in all tissue types, ranging from median 0.71-fold decrease to 1.19-fold increase (data not shown).

After butyrate treatment, the expected decrease of PKM2 protein in tumors did not occur. Unlike the data from qPCR, protein expression of the glycolytic enzyme was not significantly modified by the SCFA in normal and malignant tissues (median fold changes normal and tumor: 1.02 and 1.03, respectively, Fig. 5a, b). Further, no correlation existed between PKM2 mRNA and protein abundance of the 13 donors investigated (Fig. 5a, b). Only 20% of them exhibited an almost conformity of both parameters (deviations of fold changes less than 25%). Benign adenoma samples were observed with similar susceptibility to butyrate and showed median unaltered levels of PKM2 protein (0.97-fold, data not shown), in contrast to the gene expression data (median 0.69-fold).

In regard to HSP90 β , the up-regulation of its mRNA in normal colon cells after butyrate treatment was not reflected by the corresponding protein expression. HSP90 β protein remained nearly unchanged in the presence of butyrate (median fold change 0.88, $P = 0.95$) as compared to its transcript amount (Fig. 5c). A correlation analysis of both parameters according to Spearman confirmed this issue ($r = 0.13$, $P = 0.68$). However, for the malignant tissue a contrary result was observed which maybe points to varying transcriptional mechanisms in normal and tumor colon tissue. In agreement with qPCR experiments, the individual effects of butyrate corresponded to those observed by Western blot. A subsequent correlation analysis confirmed this link by showing a significant correlation between mRNA and protein abundance of HSP90 β ($r = 0.68$, $P < 0.05$, Fig. 5d). However, HSP90 β protein was generally not altered in tumor tissue by butyrate (median fold change 0.93).

In pre-neoplastic tissue, HSP90 β was found similar sensitive to inhibition by butyrate (median fold change 0.84) as normal tissue. Although gene expression is reflected by the protein level of HSP90 β when comparing the median expression values, no correlation could be found by comparing the individual data so far ($r = -0.50$, $P = 0.39$, data not shown).

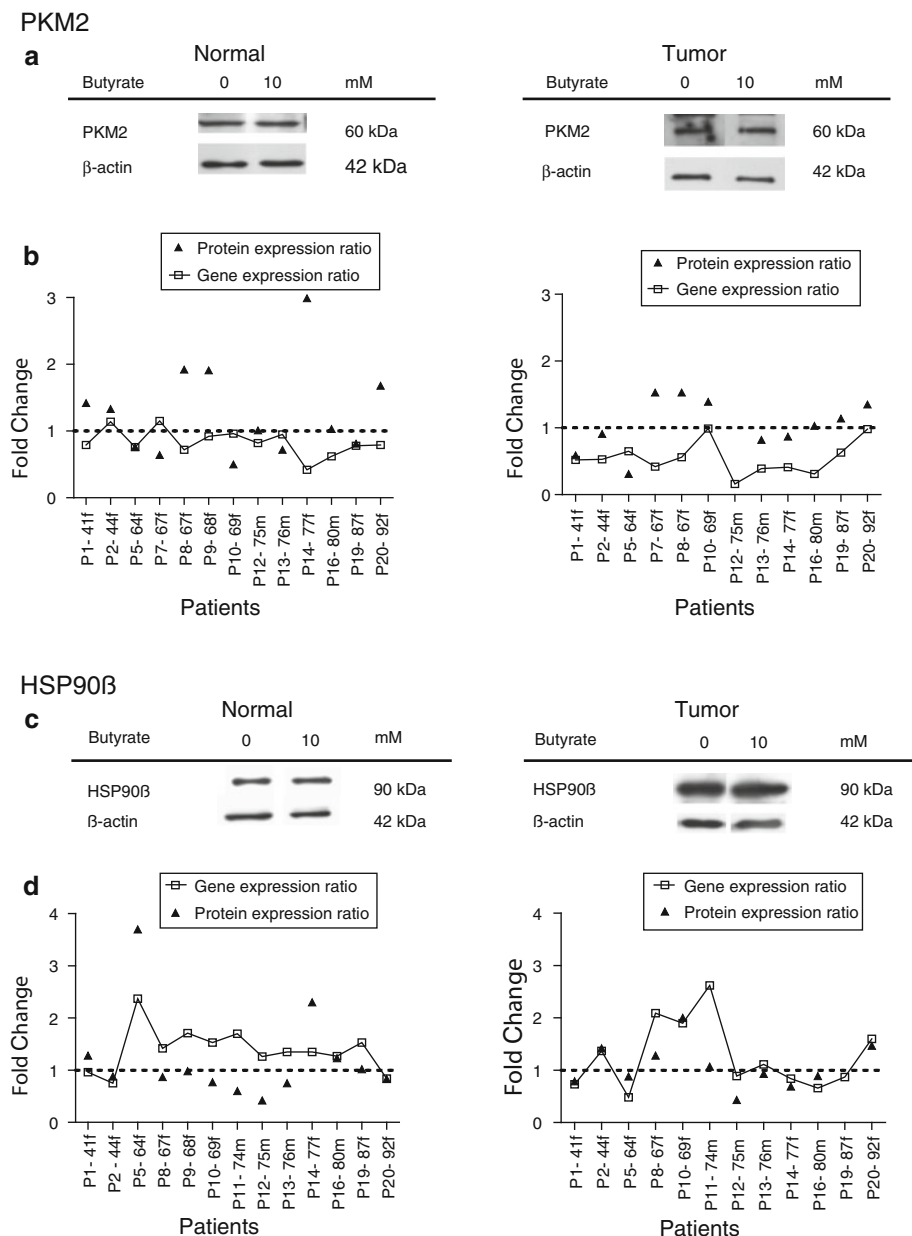
Discussion

Basal expression levels

In accordance with previous data from our own research and that of others (Koss et al. 2008), PKM2 was up-regulated in colon adenomas and tumors. But in contrast to these studies, our data were not related to tumor stage which might be due to different reasons (e.g., sample material, number of patients). Although a relative good agreement could be observed between the median gene and protein expression of the glycolytic enzyme in adenoma and tumor samples, no correlation was detected when the data were compared in a patient-wise manner. The same applies for HSP90 β . The discrepancy between mRNA and protein abundance in tumor tissue was already described by Radeva (2009) and Chen et al. (2002) for colon and lung, respectively. Research studies of this type are generally rare to be found. The inconsistencies in results may be originate from the use of different tissue pieces for the various analyses, cell-specific regulation of protein translation, or post-transcriptional mechanisms.

Furthermore, correlation tests revealed an age-related decrease of PKM2 mRNA expression in normal colon epithelium, which, however, could not be confirmed at protein level. Previous studies already reported a differential gene

Fig. 5 Effects of butyrate on PKM2 and HSP90 β protein in colon tissues of different transformation stages. **a**, **c** Representative blots of PKM2 and HSP90 β protein in paired normal and tumor colon tissue after treatment with 10 mM butyrate for 12 h. Cytosolic extracts from the different tissue types have been analyzed by Western blot using specific antibodies. β -actin served as internal loading control. **b**, **d** Protein expression ratios (fold changes) of PKM2 and HSP90 β in paired normal and tumor colon tissue after treatment with 10 mM butyrate for 12 h compared to the respective gene expression ratios. Sample material from donors was simultaneously treated with butyrate (12 h) for subsequent mRNA (qPCR) and protein expression analysis (Western blot). Results are presented in a patient (P)-wise manner, sorted by age of the patients. The small letter further differentiates between males (m) and females (f). The symbols (*filled triangle*, *open square minus*) denote the change in expression after butyrate treatment when compared to the medium control (fold change). No protein fold change could be determined for the tumor samples of patients P12 (PKM2) and P19 (HSP90 β). Ratios equal to 1 indicate no expression differences between butyrate- and non-butyrate-treated (medium) tissues ($n = 13$)



and/or protein expression for a variety of genes in senescent tissues including those involved in glycolytic energy metabolism (Cho et al. 2003; Lee et al. 2001; O'Connell et al. 2007). Expression and activity of pyruvate kinase isoenzymes were found mainly up-regulated, as for example in liver (Cho et al. 2003) and fibroblasts (Zwerschke et al. 2003). For colon tissue, no change in the glycolytic flux was noted (Fleming and Gill 1997), indicating that no enzymes of this metabolic pathway have been modified. The present finding of down-regulated PKM2 in colon cells from elderly humans is contrary to most other reports mentioned and its significance is yet not clear to date nor can be explained by the current literature.

Influence of cell culturing on expression levels

Modulation of gene expression during culturing was already observed in our previous experiments investigating cyclooxygenase-2 and osteopontin (Jahns et al. 2011) but in contrast to those, accumulation of PKM2 and HSP90 β mRNA was comparably low. PKM expression is physiologically regulated by hormonal (e.g., insulin, thyroid hormones) and nutritional influences (e.g., glucose, glutamine) (Yamada and Noguchi 1999) that are partly present in our primary cell culture medium. Decaux and colleagues demonstrated in primary rat hepatocytes expressing pyruvate kinase type L (PKL) that glucose and

insulin are indispensable for stimulation and maintenance of *PKL* mRNA expression during culturing (Decaux et al. 1989). Similar findings were also made for PKM in adipocytes (Traxinger and Marshall 1992) and thymocytes (Greiner et al. 1994).

In case of HSP90 β , no direct evidence was found as reference to the induction of its mRNA expression by medium components. The environmental and nutritional changes that are rather supposed for its increase therefore necessitate the comparison of butyrate effects to those of a medium control.

Influence of butyrate on expression levels

Studies investigating directly the regulation of PKM2 expression by bioactive compounds are apparently lacking in current literature. The present one is the first that tested the influence of the gut fermentation product butyrate on the glycolytic enzyme. In contrast to clinical studies including a large number of participants, ours represents an intermediate step which allows studying of individual effects on a small cohort of patients. Previous studies of our group in regard to the proportion of viable cells demonstrated viabilities of primary colon epithelial cells of mean 76% and intact RNA after the 12-h incubation period that were in an acceptable range for the performance of the experiments (Sauer et al. 2007). These results were shown with several individual donors. Although early apoptosis cannot be excluded at this time, other authors reported that induction of apoptosis and inactivation of survival pathways are blocked by preserving cell–cell contacts (Hofmann et al. 2007), as in the tissue strips.

The treatment of normal and tumor colon tissues with the SCFA caused a tissue-specific regulation of *PKM2* mRNA. But the effects in tumors were not reflected by the corresponding protein of *PKM2* gene. A similar result was also obtained for adenoma tissue when comparing the median fold changes. Post-transcriptional modifications of *PKM2* which might explain the difference between mRNA and protein level are not described in the literature. Further, we cannot rule out that the down-regulation of PKM2 protein was not equivalent due to the half-life of the protein and occurs possibly at a later date. Detailed information on this point is currently not available according to our search. Depending on the isoenzyme and tissue, respectively, different half-lives of pyruvate kinases are reported that all take up to several hours (Jones and Mayer 1973; Poole and Bloxham 1982). By the current improvement of our primary colon cell culture, kinetic studies above 12 h will be possible and either confirm or confute this hypothesis, prospectively.

An inhibition of PKM2 would be preferable since it is accompanied by decelerated tumor cell proliferation, as demonstrated by Spoden et al. (2008). The mechanism by

which butyrate is acting on PKM2 expression is currently unknown. It is conceivable that the SCFA might down-regulate directly or indirectly PKM2 via its HDAC inhibitory potential. HDAC inhibitors, including butyrate, have been demonstrated to target oncogenic tyrosine kinases, such as Src kinase (Hirsch et al. 2006), which are involved in the regulation of PKM2 activity (Christofk et al. 2008b). Those proteins post-translationally modify PKM2 through phosphorylation at specific tyrosine sites resulting in the disruption of the formation of the active PKM2 tetramer and consequently attenuation of catalytic activity (Hitosugi et al. 2009).

HSP90 β revealed nearly unaffected in the presence of butyrate in all tissues when compared to the respective medium controls. The exposure of normal colon tissue to butyrate (10 mM) has been initiated cellular stress responses as indicated by a slight but significant HSP90 β mRNA increase. Even if the protein level would be affected, the relevance of this alteration regarding colon carcinogenesis might crucially depend on the duration of induction. Additionally, the function of HSP90 in normal cells has to be taken into account. By protecting cells from apoptosis under stress conditions (e.g., heat shock) (Beere 2005), the increase of HSP90 β is probably an effort of the cell to support its own survival during culturing ex vivo. Similar observations after butyrate treatment (3–5 mM) were also made by Cai et al. (2006) using HT29 colon adenocarcinoma cells.

In adenoma and tumor colon tissue, neither gene nor protein expression was significantly altered by butyrate. But in contrast to normal mucosa and adenomas, both parameters demonstrated a good conformity in tumor tissue independent of age of the patients. These results suggest a different regulation of HSP90 β in the various tissues, whereby in tumors regulation is likely to occur at the transcriptional level.

Due to its involvement in carcinogenesis, HSP90 represents an interesting target in cancer therapy (Pearl et al. 2008). Besides known natural and synthetic agents, a number of different bioactive food components, such as quercetin (Aalinkeel et al. 2008), genistein (Basak et al. 2008), and epigallocatechin-3-gallate (Tran et al. 2010), were also identified as potent HSP90 inhibitors. Modulation of post-translational mechanisms is an important approach to interfere with the regulation of HSP90. The three major modifications are phosphorylation, acetylation, and S-nitrosylation (Trepel et al. 2010). With regard to the potential of butyrate as an HDAC inhibitor, HDAC 6 plays a predominant role in the regulation of HSP90 activity. HSP90 hyperacetylation that is induced by HDAC inhibitors or silencing of HDAC6 correlates with the disturbance of its chaperone function and destabilization of HSP90 client proteins (Bali et al. 2005; Kekatpure et al. 2009). Although the total protein level of HSP90 is not changed (as shown in our experiments) and solely the fraction of

acetylated HSP90 increases in this process, previous investigations demonstrated no effect of butyrate on acetylation status and ATP binding of HSP90 (Bali et al. 2005). The missing alteration is due to the structure of the SCFA. Only hydroxamic acid derivatives and seemingly phenolic components, like genistein, are able to inhibit HDAC6 activity, whereas butyrate is specifically blocking HDAC1 and 3 (Barlow et al. 2001; Marks and Xu 2009; Thangaraju et al. 2009). In a human tumor model of leukemia, a synergistic interaction has been observed by combining butyrate and the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (Rahmani et al. 2003).

Looking at the individual data, some donors have been found with increased HSP90 β levels in tumor tissue after butyrate treatment. Increased expression of HSPs or the transcriptional regulator heat shock factor 1, respectively, is associated with decreased sensitivity of tumor cells to chemopreventive drugs, such as butyrate (Cai et al. 2006) or curcumin (Rashmi et al. 2003), by protecting those from apoptosis or differentiation inducing mechanisms. To assess the meaning of this increase and its consequences for the application of chemopreventive drugs, kinetic studies will prospectively clarify, if this increase is of transient or persistent nature.

In summary, PKM2 has been identified as a potential target of the chemopreventive agent butyrate in human colon tumors. Although HSP90 β was not modified by the SCFA in malignant tissue in general, a group of patients was observed with increased levels of HSP90 β after treatment. Further studies should clarify which conditions permit this reaction and its duration, as well as find out more details about the post-transcriptional and translational machinery of PKM2.

Acknowledgments The present study was supported by the German Research Foundation (DFG, PO 284/8-3). Additionally, we are grateful to Kerstin Kalmring-Raspe, Dr. Wiebke Schlörmann, and Nadja Jablonowski for technical assistance and their helpful encouragement. We also thank Misses Kornelia Haus who edited the language of the manuscript and all tissue donors for giving their informed consent and thereby allowing the performance of this study.

Ethical standards The study has been approved by the ethics committee of the University Hospital of Jena, Germany (no. 1601-08/05) and has therefore been performed in compliance with the Declaration of Helsinki and its later amendments. Prior to study participation, all patients gave their informed consent.

Conflicts of interest None.

References

- Aalinkel R, Bindukumar B, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, Schwartz SA (2008) The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate* 68:1773–1789
- Akalin A, Elmore LW, Forsythe HL, Amaker BA, McCollum ED, Nelson PS, Ware JL, Holt SE (2001) A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase regulation during prostate cancer progression. *Cancer Res* 61:4791–4796
- Bali P et al (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280:26729–26734
- Barlow AL, van Drunen CM, Johnson CA, Tweedie S, Bird A, Turner BM (2001) dSIR2 and dHDAC6: two novel, inhibitor-resistant deacetylases in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* 265:90–103
- Basak S, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Mol Cancer Ther* 7:3195–3202
- Becker B, Multhoff G, Farkas B, Wild PJ, Landthaler M, Stolz W, Vogt T (2004) Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp Dermatol* 13:27–32
- Beere HM (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 115:2633–2639
- Bingham SA et al (2003) Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361:1496–1501
- Borowicki A, Michelmann A, Stein K, Scharlau D, Scheu K, Obst U, Gleis M (2011) Fermented wheat aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates markers of tumor progression in human colon cells. *Nutr Cancer* 63:151–160
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW (2007) Hsp90—from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 363:241–246
- Byun S, Lee KW, Jung SK, Lee EJ, Hwang MK, Lim SH, Bode AM, Lee HJ, Dong Z (2010) Luteolin inhibits protein kinase C(epsilon) and c-Src activities and UVB-induced skin cancer. *Cancer Res* 70:2415–2423
- Cai J, Kirilina WG, Chen Y, Yan X, Jones DP, Sartorelli AC (2006) Overexpression of heat shock factor 1 inhibits butyrate-induced differentiation in colon cancer cells. *Cell Stress Chaperones* 11:199–207
- Chen G, Gharib TG, Huang CC et al (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:304–313
- Cho YM, Bae SH, Choi BK, Cho SY, Song CW, Yoo JK, Paik YK (2003) Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice. *Proteomics* 3:1883–1894
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC (2008a) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452:230–233
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC (2008b) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452:181–186
- Decaux JF, Antoine B, Kahn A (1989) Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 264:11584–11590
- Diehl MC, Idowu MO, Kimmelschue K, York TP, Elmore LW, Holt SE (2009) Elevated expression of nuclear Hsp90 in invasive breast tumors. *Cancer Biol Ther* 8:1952–1961

- Elmore LW, Forsythe R, Forsythe H, Bright AT, Nasim S, Endo K, Holt SE (2008) Overexpression of telomerase-associated chaperone proteins in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinomas. *Oncol Rep* 20:613–617
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601–1613
- Fleming SE, Gill R (1997) Aging stimulates fatty acid oxidation in rat colonocytes but does not influence the response to dietary fiber. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52:B318–B330
- Fridrich D, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D (2008) Comparison of delphinidin, quercetin and (–)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol Nutr Food Res* 52:815–822
- Greiner EF, Guppy M, Brand K (1994) Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. *J Biol Chem* 269:31484–31490
- Guo W, Zhang Y, Chen T, Wang Y, Xue J, Zhang Y, Xiao W, Mo X, Lu Y (2011) Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:65–72
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27:104–119
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
- Hirsch CL, Smith-Windsor EL, Bonham K (2006) Src family kinase members have a common response to histone deacetylase inhibitors in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 118:547–554
- Hitosugi T et al (2009) Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal* 2:ra73
- Hofmann C, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, Schoelmerich J, Rogler G, Grossmann J (2007) Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 132:587–600
- Jahns F, Wilhelm A, Jablonowski N, Mothes H, Radeva M, Wolfert A, Greulich KO, Gleit M (2011) Butyrate suppresses mRNA increase of osteopontin and cyclooxygenase-2 in human colon tumor tissue. *Carcinogenesis* 32:913–920
- Jones GM, Mayer RJ (1973) Degradation of glucose-metabolizing enzymes in the rat small intestine during starvation. *Biochem J* 132:657–661
- Kekatpure VD, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K (2009) HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Biol Chem* 284:7436–7445
- Kim YS, Milner JA (2011) Bioactive food components and cancer-specific metabolomic profiles. *J Biomed Biotechnol* 2011:721213
- Koss K, Maxton D, Jankowski JA (2008) Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention. *Colorectal Dis* 10:244–248
- Lee HM, Greeley GH Jr, Englander EW (2001) Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats. *Mech Ageing Dev* 122:355–371
- Lin K, Rockliffe N, Johnson GG, Sherrington PD, Pettitt AR (2008) Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 27:2445–2455
- Marks PA, Xu WS (2009) Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 107:600–608
- Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E (2005) Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 15:300–308
- Milicevic Z, Bogojevic D, Mihailovic M, Petrovic M, Krivokapic Z (2008) Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cancer cells and its association with tumour progression. *Int J Oncol* 32:1169–1178
- Moser C, Lang SA, Kainz S, Gaumann A, Fichtner-Feigl S, Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2007) Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* 6:2868–2878
- Neckers L (2007) Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci* 32:517–530
- O’Connell K, Gannon J, Doran P, Ohlendieck K (2007) Proteomic profiling reveals a severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle. *Int J Mol Med* 20:145–153
- Pearl LH, Prodromou C, Workman P (2008) The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 410:439–453
- Peipins LA, Sandler RS (1994) Epidemiology of colorectal adenomas. *Epidemiol Rev* 16:273–297
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Picard D (2011) HSP90 interactors. <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>. Accessed 16 June 2011
- Poole GP, Bloxham DP (1982) The turnover of L-type pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 204:89–95
- Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wolff S (2005) Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 26:1064–1076
- Radeva M (2009) Expression analysis of a selected gene set in malignant and non-malignant tissues derived from individuals with colon cancer. Comparison with protein expression data. Dissertation, University of Jena
- Rahmani M, Yu C, Dai Y, Reese E, Ahmed W, Dent P, Grant S (2003) Coadministration of the heat shock protein 90 antagonist 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin with suberoylanilide hydroxamic acid or sodium butyrate synergistically induces apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res* 63:8420–8427
- Rashmi R, Santhosh Kumar TR, Karunagaran D (2003) Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases. *FEBS Lett* 538:19–24
- Rogler G, Daig R, Aschenbrenner E, Vogl D, Schlottmann K, Falk W, Gross V, Schölmerich J, Andus T (1998) Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest* 78:889–890
- Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL (2007) Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *Br J Nutr* 97:928–937
- Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Gleit M (2009) Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 682:39–53
- Spoden GA, Mazurek S, Morandell D, Bacher N, Ausserlechner MJ, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E, Zwerschke W (2008) Isotype-specific inhibitors of the glycolytic key regulator pyruvate kinase subtype M2 moderately decelerate tumor cell proliferation. *Int J Cancer* 123:312–321
- Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, Ganapathy V (2009) Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death

- caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J* 417:379–389
- Tran PL, Kim SA, Choi HS, Yoon JH, Ahn SG (2010) Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 10:276
- Traxinger RR, Marshall S (1992) Insulin regulation of pyruvate kinase activity in isolated adipocytes. Crucial role of glucose and the hexosamine biosynthesis pathway in the expression of insulin action. *J Biol Chem* 267:9718–9723
- Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L (2010) Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:537–549
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
- Wolever TM, Chiasson JL (2000) Acarbose raises serum butyrate in human subjects with impaired glucose tolerance. *Br J Nutr* 84:57–61
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40:235–243
- Yamada K, Noguchi T (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* 337(Pt 1):1–11
- Yin Z, Henry EC, Gasiewicz TA (2009) (–)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor. *Biochemistry* 48:336–345
- Zhang Y, Zhou L, Bao YL, Wu Y, Yu CL, Huang YX, Sun Y, Zheng LH, Li YX (2010) Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chem Biol Interact* 185:174–181
- Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P (1999) Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1291–1296
- Zwerschke W, Mazurek S, Stockl P, Hutter E, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P (2003) Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* 376:403–411

2.4 Publikation IV: Butyrate modulates antioxidant enzyme expression in malignant and non-malignant human colon tissues. Franziska Jahns, Anne Wilhelm, Nadja Jablonowski, Henning Mothes, Karl Otto Greulich, Michael Gleis. Eingereicht bei *Molecular Carcinogenesis* am 24.04.2013

Die Modulation antioxidativer Enzymsysteme ist ein bedeutender Mechanismus, der bei der Beurteilung potenziell chemopräventiver Substanzen ebenso wie bei der Bekämpfung von Tumoren eine Rolle spielt. Superoxiddismutase (SOD) 2 und Katalase (CAT) sind hierbei aufgrund ihrer Fähigkeit, reaktive Superoxidanionen bzw. Wasserstoffperoxid zu eliminieren besonders relevant. Die vorliegende Studie hat daher deren Modulierbarkeit durch Butyrat in verschiedenen transformierten Kolongeweben untersucht. Quantitative Genexpressionsanalysen (Real-time PCR) zeigten eine verminderte *CAT* bzw. erhöhte *SOD2* mRNA-Expression in Tumoren im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe. Die Zunahme der *SOD2*-Menge konnte darüber hinaus auch auf Protein (Western Blot)- und Aktivitätsebene (*SOD2* Assay) bestätigt werden. Zusätzlich wurde ein altersabhängiger Abfall beider Enzymaktivitäten in der normalen Kolonmukosa beobachtet, der in dieser Studie erstmalig beschrieben ist. Nach Applikation von Butyrat *ex vivo* (10 mM, 12 h) konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA- und Proteinmenge von *CAT* im normalen Kolongewebe gezeigt werden, der vorerst ohne nachweisbare Folgen für die enzymatische Aktivität und den Schutz des Gewebes vor H_2O_2 -induzierten Schäden blieb. Im Unterschied zu *CAT* führte Butyrat zu einer Reduktion der *SOD2*-Transkriptmenge im Normal- und Tumorgewebe, die in geringerem Umfang auch auf Proteinebene des Normalgewebes sichtbar wurde. Dennoch gelang es, eine signifikante Steigerung der enzymatischen Aktivität der *SOD2* sowohl im Normal- als auch im Adenomgewebe nach Butyrat-Exposition nachzuweisen. Eine Induktion der *CAT* und *SOD2* könnte dabei zu einem verbesserten Schutz beitragen, der folglich das Risiko einer Entartung senkt.

Eigenanteil:

- Aufarbeitung und Inkubation der Gewebeproben mit Butyrat
- Bestimmung der *SOD2*-Aktivität
- Untersuchung der DNA-Schädigung mittels Comet Assay
- Darstellung und Interpretation der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskripts

Butyrate modulates antioxidant enzyme expression in malignant and non-malignant human colon tissues

Franziska Jahns ^{a,c,§,*}, Anne Wilhelm ^{a,c}, Nadja Jablonowski ^{a,#}, Henning Mothes ^b, Karl Otto Greulich ^c, and Michael Gleis ^a

^a Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, 07743 Jena, Germany

^b Department of General, Visceral and Vascular Surgery, Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany

^c Department of Single Cell and Single Molecule Techniques, Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute, 07745 Jena, Germany

[§] Present address: Center for Molecular Biomedicine, Department of Biophysics, Friedrich Schiller University Jena, 07745 Jena, Germany

[#] Present address: Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, 07745 Jena, Germany

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 3641 949674; Fax: +49 3641 949672; Email: franziska.jahns@uni-jena.de

Abbreviated Title: Butyrate-induced stress response in the colon

Abbreviations: CAT, catalase; cDNA, complementary DNA; H₂O₂, hydrogen peroxide; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; SCFAs, short chain fatty acids; SOD2, superoxide dismutase 2

Keywords: dietary fiber; colorectal cancer; catalase; superoxide dismutase 2; chemoprevention

This work was supported by the German Research Foundation (PO 284/8-3).

Abstract

The gut fermentation product butyrate is associated with several beneficial effects related to the prevention of colonic tumors, including induction of antioxidant enzymes. However, much of this work has been performed by the use of colon cancer cell lines or animal models and the response of human colonic epithelial tissue is largely unknown. Therefore, our study focused on the impact of butyrate on catalase (CAT) and superoxide dismutase 2 (SOD2) in matched human colon tissues of different transformation stages (n=3-15 per group) *ex vivo*. By performing quantitative real-time PCR, Western blot, and spectrophotometric measurements, we observed an increase in SOD2 expression and activity in colonic tumors when compared to normal tissues (mRNA: 1.96-fold; protein: 1.41-fold, activity: 1.8-fold; p<0.05). CAT expression varied only significantly at mRNA level between normal and tumor tissue. Apart from this, the activity of both enzymes was found to be age-related in normal epithelium (CAT: r= -0.49, p=0.09; SOD2: r= -0.58, p=0.049). Treatment of normal tissue (12 h) with butyrate (10 mM) resulted in a significant increase (p<0.05) in CAT mRNA (1.24-fold) and protein (1.39-fold), without affecting the enzymatic activity. Consequently, no protective effect was shown against H₂O₂-mediated DNA damage. Despite a lower expression of SOD2 (mRNA: 0.51, p<0.05; protein: 0.86) after butyrate exposure of normal colon cells, its catalytic activity was significantly enhanced (1.19-fold, p<0.05). In malignant tissues, a greater range of responses to butyrate could be documented. In conclusion, butyrate exhibited potential antioxidant features *ex vivo*, strengthening the risk lowering effect of dietary fiber consumption.

INTRODUCTION

Antioxidant enzymes are part of a series of defense mechanisms that have been evolved by organisms in response to exposure to free radicals [1]. The superoxide dismutase (SOD) enzyme family plays a key role in this context by providing a first line of defense against superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$). This radical species is mostly generated during the electron transport chain in mitochondria, the major source of free radicals under normal conditions [2]. The manganese containing SOD2 isoform is located in the matrix of mitochondria and eliminates the resulting $O_2^{\cdot-}$ by catalyzing the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ to the less toxic hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen [3]. H_2O_2 is further converted to water and molecular oxygen, inter alia by the enzymatic activity of catalase (CAT), which is located in the peroxisomes [4]. An up-regulation of antioxidant defense mechanisms, including SOD and CAT, has been associated with the suppression or reduction of colonic tumors [5,6] and is regarded as a protective mechanism in the context of colon cancer chemoprevention. Besides its protective role in normal tissues, several human tumor entities were found with deregulated levels of both enzymes, including colorectal tumors [7,8].

Malignant diseases of the colon and rectum are one of the most common causes of cancer incidence and mortality worldwide [9]. The majority of sporadic tumors (70 %) are strongly nutrition-related and associated, for example, with a high consumption of red meat and a low level of physical activity [10]. Dietary fiber, however, is considered to be protecting, based on several cohort studies that are supported by experimental evidence [11,12]. Short chain fatty acids (SCFAs), which result from the colonic fermentation of soluble dietary fibers, may contribute to the risk lowering effects. Among them, butyrate seems to be the most potent [13] and was shown to have a variety of anti-cancer properties, including modification of antioxidant and detoxifying enzymes [14,15]. However, most of this work has been performed by the use of colon cancer cell lines and animal models. Studies using primary human colon tissue, on the other hand, are relatively rare. Therefore, the primary aim of the present study was to elucidate whether genes involved in pathways of oxidative stress (SOD2, CAT) are altered in paired primary human colon tissues of different transformation stages by applying a physiologically relevant concentration of butyrate. A secondary aim was to assess whether these results are linked to functional consequences by measuring the H_2O_2 -induced genotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Patient Material

An initial set of matched normal, adenoma and/or tumor colon tissues was obtained from 13 patients with colorectal cancer or colon polyps (5 males, 8 females; mean age \pm SD (range 41-87) 63 ± 15 years) during surgical resections at the Jena University Hospital. Normal tissue was taken at least 10 cm from the tumor site. Immediately after removal, storage and preparation of the tissue samples occurred as previously described [16,17]. Stage and grading of the resected tumors were evaluated by histopathological examination according to the UICC classification at the Institute of Pathology in Jena. Samples from this group of patients (2 with stage I, 3 with stage II, 4 with stage III, and 4 with stage IV; none with tumor grading (G) 1, 8 with G2, 4 with G3, and one unknown sample) were used to determine gene and protein expression levels of SOD2 and CAT as well as their corresponding enzyme activity. In addition, 8 patients with colorectal cancer or polyposis (6 males, 2 females; mean age \pm SD (range 47-82) 70 ± 11 years), providing 8 normal, 6 adenoma, and 4 tumor colon tissues, were included in the measurement of SOD2 activity due to the limited availability of sample material. From a third group of patients with colorectal cancer (2 males, 1 female; mean age \pm SD (range 49-86) 71 ± 19 years) only normal colon tissues were available and used for the assessment of the supposedly protective effect of butyrate towards H₂O₂-induced DNA damage. Tissue material from these patients was also collected during surgical resections.

The University Ethics Committee approved the study (no. 1601-08/05), which was performed in compliance with the ethical standards defined in the Declaration of Helsinki and its later amendments. Participants gave their informed consent before the start of studies.

Treatment of Colon Tissue with Butyrate

Simultaneously, epithelial strips from all 3 tissue types were treated with a physiologically relevant concentration of butyrate (10 mM) for 12 h as previously described [16]. The primary cell culture medium, in which butyrate was dissolved, served as a control. The medium consisted of minimal essential medium (MEM) with Earle's salts enriched with 20 % fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 μ g/ml gentamicin, 2.5 μ g/ml fungizone, 10 ng/ml epidermal growth factor, 5 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin and 5 ng/ml sodium selenite according to Rogler *et al.* [18].

Isolation of RNA and Reverse Transcription

RNA isolation and complementary DNA (cDNA) synthesis were performed as previously described [16]. Briefly, total RNA was isolated from the homogenized tissue samples using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol, followed by spectrophotometric quantification with the NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Integrity of the RNA was determined with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Due to variations in quantity, 100-2500 ng of total RNA was used for reverse transcription with the SuperScript II First Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen, Darmstadt, Germany).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

QPCR was carried out under conditions described by Jahns *et al.* [16]. Briefly, 2 µl cDNA prepared from different starting concentrations of total RNA were amplified in three steps using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany) and 10 pmol gene-specific primers: *CAT* forward, 5'-TGG ACA AGT ACA ATG CTG AG -3' and reverse, 5'-TTA GGA TGA ACG CTA AG -3'; *SOD2* forward, 5'-GCC CTG GAA CCT CAC ATC AAC -3' and reverse, 5'-CAA CGC CTC CTG GTA CTT CTC -3'; *β-actin* forward, 5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT-3' and reverse, 5'-CCCACGATGGAGGGGAAGAC-3'; *β-glucuronidase* (GUS) forward, 5'-TGCAGGTGATGGAAGAAGTG-3' and reverse, 5'-TTGCTCACAAAGGTCACAGG-3'. Calculation of relative gene expression values was performed as described by Jahns *et al.* [16] based on the efficiency of primer pairs (range: 97-104 %) and quantification cycle.

Cytosol Extraction and Western Blot Analysis

The initial set of 13 donors was also used to examine protein expression. Therefore, matched treated and untreated (basal) normal, adenoma and tumor tissue strips were homogenized as previously described [16]. Total protein contents of the homogenates were determined after centrifugation (16 000 g, 10 min, 4 °C) according to Bradford [19]. For detection of CAT and SOD2 protein, equal amounts of total protein (10 µg) were diluted with 5x concentrated loading buffer (250 mM Tris/HCl (1 M) pH 6.8; 10 % SDS; 50 % glycerol; 0.1 % bromphenolblue and 0.5 M dithiothreitol), separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (stacking

gel: 4 %; separating gel: 12 %; Bio-Rad, Munich, Germany) and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman, Florham Park, NJ). Subsequently, the membrane was blocked with 5 % nonfat dried milk powder (1 h; AppliChem, Darmstadt, Germany) and incubated with the following primary and secondary antibodies: CAT and SOD2 (Acris Antibodies, Herford, Germany), β -actin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG-HRP (Dako, Hamburg, Germany) and Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (Dako). Proteins were visualized using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) followed by densitometric measurement using Quantity One software, version 4.1 (Bio-Rad). The data were normalized to β -actin (internal loading control) and presented as relative expression compared to the medium control (fold change).

Measurement of Antioxidant Enzyme Activities

Cytosols prepared for Western blot analyses were further used to assess CAT activity according to the method of Aebi [20]. The decomposition of H_2O_2 into O_2 and H_2O was determined spectrophotometrically (240 nm) at 22 °C in a total volume of 1 ml, consisting of 50 mM phosphate buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM K_2HPO_4 ; pH 6.5), 10 mM H_2O_2 and 100 μl cytosol. Enzyme activities were calculated according to Lambert-Beer's law using $0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{ x}^{-1}$ as absorption coefficient at 240 nm.

SOD2 enzyme activity was measured using a commercially available SOD assay kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI). Colon tissue strips dissected were homogenized in cold 20 mM HEPES buffer (pH 7.2) containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose with a Polytron homogenizer 2100 (Kinematica AG, Littau/Lucerne, Switzerland), sonicated (2 x 15 s, 6 cycles, 40 % of power), and centrifuged (10 000 g, 15 min, 4 °C). The supernatants were appropriately diluted to enable measurements within the standard range (basal (untreated) samples 1:30/60; butyrate-treated specimens 1:10). SOD2 activity was assayed specifically with the addition of 3 mM sodium cyanide. Enzyme activity (U/ml) was calculated according to manufacturer's instructions and standardized for protein determined by the Bradford assay [19].

Comet Assay

Normal colon tissues derived from a third group of donors were treated with 10 mM butyrate as described above. Single cells were isolated from epithelial strips by mincing, followed by enzymatic

digestion with 3 mg collagenase P (Boehringer, Mannheim, Germany) and 3 mg proteinase K (Sigma-Aldrich) dissolved in 5 ml HBSS (90 min, 37 °C). The final steps of cell isolation were identical to the procedure described by Wilhelm *et al.* [21]. Fifty thousand cells of each medium- or butyrate-treated sample were subsequently treated with 75 μ M H₂O₂ (5 min, 37 °C) and checked for their vitality by trypan blue exclusion test [22]. The Comet Assay was performed as alkaline version according to Tice *et al.* [23]. In short, cells were embedded into low melting agarose on pre-coated microscope slides, lysed for 60 min and incubated in alkaline (pH > 13) electrophoresis buffer. The resulting single-stranded DNA fragments were electrophoretically separated under the same alkaline conditions at 1.25 V/cm and 300 mA for 20 min, washed with phosphate buffered saline (3 x 5 min) and stained with SYBR green fluorescence dye (1 μ l/ml, Sigma-Aldrich). DNA migration was microscopically quantified using a ZEISS Axiovert 25 microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and the Comet assay II image analysis system from Perceptive Instruments (Haverhill, Suffolk, UK). 3 x 20 cells or comets of each sample were scored, median values of tail intensity (percentage of fluorescence in the comet tail) were calculated from at least 3 independently performed experiments.

Statistical Evaluation

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism Software 5 (GraphPad, San Diego, CA). By using the nonparametric Wilcoxon matched pairs test or the Kruskal-Wallis test two or multiple groups were examined for significant differences, respectively. The correlation between two parameters was evaluated by the Spearman's rank correlation test. Gender differences were identified by the Mann Whitney test. All results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

SOD2 and CAT are Deregulated in Human Colon Tumors

SOD2 transcript amounts were up to 9-fold higher in 10 out of 13 colon tumors as compared to normal tissue (median 1.86-fold, $p < 0.05$, Figure 1A). Similarly, more than half of tumors showed an up to 7-fold increase in SOD2 protein expression (median 1.41-fold, $p = 0.18$, Figures 1B and 1C) that correlated significantly with the corresponding SOD2 gene expression level ($r = 0.63$, $p = 0.03$). In adenomas (2/3), SOD2 was slightly but non-significantly elevated only at protein level (median

fold change: 1.21; Figures 1A, 1B and 1C). SOD2 mRNA and protein were expressed independently of tumor stage and grading (data not shown).

By contrast, CAT mRNA levels were down-regulated in adenoma (3/3) and tumor (10/13) ($p < 0.01$) colon tissues by 30-70 % when compared to their normal counterparts (Figure 1D). Differences between both types of tissues were not detected, both exhibiting nearly identical median fold decreases (adenoma: 48 %, tumor: 46 %). Noteworthy, no differences in CAT protein expression had occurred between the various tissue types (Figures 1E and 1F). In comparison to gene expression data, only 6 of 13 tumors showed diminished CAT levels, whereas the remaining exhibited increased (5 of 13) or unaltered (1 of 13; one was not detectable) expression.

Opposite results were obtained for CAT protein in adenoma tissue samples. In contrast to its transcript level, CAT was found in higher levels when compared to normal tissue. Due to the limited number of adenomas the significance of this result is yet unclear. Correlation analyses showed neither an association between basal CAT mRNA and protein level, nor tumor stage or grading (data not shown). Furthermore, no differences in the expression of both CAT and SOD2 were detected between women and men.

SOD2 mRNA and, to a Lesser Extent, Protein Expression are Reduced by Butyrate

Normal colon tissues of 13 patients uniformly showed a significantly decreased SOD2 mRNA expression after butyrate administration (Fold changes 0.28-0.79, median fold decrease: 0.51, Figure 2A). This down-regulation was also visible to a lesser extent at the protein level (Figure 2B; median fold decrease: 0.86), although no correlation was identified when the individual gene and protein expression ratios were compared. However, by using the median expression values, a relation between SOD2 mRNA and protein might be assumed.

No significant differences were observed for adenoma tissue (Figures 2A and 2B). Tumors, however, were similarly sensitive to the SCFA as their normal counterparts. Eleven of thirteen malignant samples showed decreased amounts of SOD2 transcripts with fold changes ranging from 0.35 to 0.87 (median 0.71, $p = 0.002$; Figure 2A). This influence of butyrate was also reflected by a decreased median SOD2 protein expression (fold change 0.84), which was not significantly different from that of the controls (Figure 2B). Despite consistent effects at both median expression levels, no correlation could be detected when the individual data were analyzed.

Butyrate Induces CAT mRNA and Protein Expression in Normal Colon Epithelium

In contrast to SOD2, butyrate significantly increased *CAT* mRNA as well as protein expression in normal colon tissue when compared to the respective controls (Figures 3A and 3B). Ten of thirteen donors in total showed 1.13 to 1.91-fold enhanced mRNA levels (median 1.24 fold), whereas others were found with decreased or unchanged transcript levels. Similarly, for *CAT* protein, increases in expression were detected in 9 out of 13 donors (fold changes ranging from 1.24 to 2.45, median 1.39-fold). Although no significant positive correlation was found between *CAT* mRNA and protein ($r=0.40$, $p=0.17$), the majority of subjects (9 of 13) showed consistent effects that are also reflected by the median values.

Benign adenoma tissues responded similarly to butyrate as normal tissues (Figures 3A and 3B). Here, 2 of 3 donors showed 1.12 and 1.79-fold increased amounts of *CAT* transcripts, respectively. Opposite effects, however, were observed at the protein level.

In contrast to non-malignant tissues, tumors showed larger individual variations in response to butyrate and did not exhibit significant differences (Figures 3A and 3B). Half of the donors had elevated *CAT* mRNA expression following butyrate treatment (1.32 to 2.46-fold). The others expressed either decreased (0.88 to 0.47-fold) or unaltered (0.95 to 1.03-fold) levels of *CAT* mRNA compared to the respective medium controls. Similar individual effects were also apparent at the protein level. Despite the lack of significant correlation between *CAT* mRNA and protein in tumor tissue after butyrate exposure ($p=0.17$), the median expression levels of both parameters were similar, indicating an overall relationship (median fold changes gene vs. protein expression: 1.03 vs. 0.89).

Although different influences of butyrate on gene expression of both antioxidant enzymes in the various tissues were observed, the expression of *CAT* and SOD2 protein was similarly altered within one tissue type as well as between normal and tumor colon tissue. This association was identified by correlation analyses which found a significant (tumor) or almost significant (normal) agreement between the changes in protein levels of both enzymes after butyrate treatment (tumor: $r_{\text{CAT,SOD2}}=0.76$, $p<0.01$; normal: $r_{\text{CAT,SOD2}}=0.55$, $p=0.05$).

SOD2 Activity Depends on the Age of Donors and Increases in the Colonic Mucosa during Butyrate Exposure

Measurement of SOD2 activity could only be performed with selected samples of the original set of patients since available colon tissues were limited. In order to increase significance, data of butyrate-treated tissues were complemented by those of a further set of tissues derived from 8 patients.

Nine out of twelve available colon tumors (75 %) showed an increased SOD2 activity when compared to the respective normal colon tissues ($p=0.009$; Figure 4A). Adenomas ($n=3$) had clearly decreased SOD2 activity levels, but this difference was not yet considered as statistical significant (median fold change 0.52). Correlation analysis identified a significant inverse relationship between the enzymatic activity of SOD2 in normal epithelial tissue and the age of patients ($r= -0.58$, $p=0.049$; Figure 4B). The activity varied between the youngest (41 years) and oldest donor (87 years) by a factor of 12. In contrast to the gene and protein data that correlated significantly, no relationship could be detected between the individual SOD2 protein and activity data ($r=0.23$, $p=0.48$). Nevertheless, a correlation was noted in colonic tumors when using the median expression and activity ratios.

The treatment of normal colon epithelium with butyrate resulted in an up-regulation of SOD2 activity, attaining significance when the number of donors was increased (median fold change 1.19, patients: 15, $p<0.05$, Figure 4C). Similar changes were found in adenoma tissues, showing invariably elevated levels of SOD2 activity after butyrate treatment (median fold change: 1.52, $p=0.03$, Figure 4D). No consistent pattern of SOD2 activity, however, was observed in colon tumor tissue after application of butyrate, so far (median fold change 0.91, patients: 12, $p=1.00$, Figure 4E).

CAT Activity in Human Colon Epithelial Cells Tends to Decrease with Age

Consistent with CAT protein level, no significant difference in activity was detectable between normal, adenoma and tumor colon samples (Figure 5A). Half of the tumors showed decreased basal activity levels of CAT, whereas the other half had increased levels independent of tumor stage or grading (median fold change 1.91, $p=0.27$). Nevertheless, neither median nor individual values of CAT protein and activity were significantly correlating ($r=0.07$, $p=0.83$). Adenoma

samples exhibited median decreased CAT activity (0.43-fold, $p=0.5$), thereby reflecting its mRNA expression pattern.

In contrast to mRNA and protein expression, CAT activity tended to correlate inversely with the age of donors in normal colon epithelial cells ($r= -0.49$, $p=0.09$, Figure 5B).

Butyrate Does Not Alter CAT Enzyme Activity in Colon Tissues

The induction of CAT gene and protein expression by butyrate in normal colon tissue was not accompanied by an increased enzymatic activity (median fold change 1.01, $p=0.67$; Figure 5C). Only 5 of 13 investigated donors showed 1.12- to 2.10-fold increased activity levels. This result was further verified by correlation analysis showing no association between protein and activity data.

CAT activity in adenoma and tumor samples was also not significantly changed after butyrate has been applied (Figure 5C). Adenoma tissues were observed with a median 1.19-fold increase in CAT activity that is comparable to the mRNA rise (1.12-fold) but not to protein expression (0.68-fold). Tumors showed an even higher biological variation in activity (1.24-28.05 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{g}$ protein) compared to the protein expression data (0.64-2.53). Similar to CAT protein, an equivalent number of donors were found with decreased or increased activity, whereas the rest remained insensitive to the SCFA. Despite the fact, that no protein-activity correlation was found in tumor samples after butyrate incubation, a relative good agreement was noted between the median fold changes of both parameters (protein expression: 0.89 versus activity: 1.00).

Butyrate couldn't Protect Normal Epithelial Colon Cells from H_2O_2 -Induced Genotoxicity

In a further series of experiments using a third set of normal colon tissues derived from 3 donors, we investigated the ability of butyrate to protect normal colon cells against H_2O_2 -induced DNA damage as a functional consequence of the elevated protein expression of CAT (data not shown). After 12 h pre-incubation DNA of normal colonocytes from 2 donors was not damaged by butyrate (10 mM), while colonocytes from a third donor were observed with markedly enhanced DNA damage when compared to the respective medium-treated sample. The following exposure with H_2O_2 resulted in an increase in DNA damage in normal colon cells of all tissue donors which could not be reduced by butyrate (median 19.87 and 21.31 % tail intensity at 0 (medium) and 10 mM

butyrate after H₂O₂ treatment, respectively). These results indirectly confirm the lack of increase in CAT activity following butyrate treatment.

DISCUSSION

SOD2 was found to be significantly up-regulated in colonic tumors at mRNA, protein and activity level independent of tumor staging or grading. In general, these results could confirm previous reports, whereas contradictory findings exist in relation to correlation of expression with those clinicopathological parameters [7,24,25,26]. Adenomas expressed varying amounts of SOD2 when comparing the three expression levels, allowing no final conclusion due to the limited number of donors.

For CAT, no significant differences were noted between normal and diseased colon tissues, with the exception of transcript levels. The majority of previous studies [27,8,28,29], however, demonstrated a lower catalytic activity of the antioxidant enzyme in tissue and plasma of colon cancer patients that is only consistent with our gene expression data. Moreover, Cable *et al.* [30] detected a significant relationship between CAT enzyme activity and the stage of tumors. Such a relation was not found during the present investigation.

Besides differences at the expression levels between normal and transformed colon tissue, substantial variations in CAT and SOD2 expression and activity were also observed between the individual donors. Genetic polymorphisms [31,32], nutrition and life style factors [31,33,34] are known to have an impact on antioxidant enzymes. In addition, the age of the donors was identified as a further important parameter [35,36]. Concerning CAT, our data partly support this relationship, but published work on CAT enzyme level are generally inconsistent, and results were mainly determined from the blood of a much higher number of healthy human volunteers [37,35,36]. SOD2 activity, however, was significantly and inversely correlated with the age of donors in normal colon tissue. This association was already demonstrated by Fujimoto *et al.* [38], for example, but only in blood leukocytes. For normal colon epithelium this correlation was shown for the first time, according to our knowledge.

Currently, antioxidant activity is one of the most common *in vitro* parameters used to assess or predict potential benefits of nutrition-related compounds. SOD2 plays a key role in the protection of mitochondria against reactive oxygen species that would otherwise result in deadly

consequences [39]. In addition to Sauer *et al.* [15], this study measured an increase in SOD2 activity in normal colon cells after application of butyrate, although its mRNA and, to a lesser extent, its protein level have been decreased; these results possibly point to a kinetic regulation of the enzyme. So far, only Ochel and colleagues [40] demonstrated an increase in total SOD activity in Caco-2 colon carcinoma cells after 4 days of butyrate treatment. Our own measurements also showed a similar modulation of total SOD activity by butyrate in normal colon epithelial cells but surprisingly no correlation between the individual SOD2 and total SOD activities of the donors was detectable (data not shown). Whereas in normal colon tissue the activity of SOD1 was reflected by that of total SOD, malignant tissue was marked by a significant correlation between SOD2 and total SOD activity (data not shown).

Besides normal colon epithelium, SOD2 activity was also significantly increased in adenoma tissue, whose cells are one of the main targets in colon cancer chemoprevention. An up-regulation of SOD2 activity in normal and pre-cancerous colon tissue might probably be linked to increased protection and consequently the prevention of further transformation into malignant tumors.

In cancer cells, no significant change in SOD2 activity has been observed after butyrate treatment, thereby demonstrating the restriction of butyrate's anti-cancer properties to pre-cancerous lesions. Due to its tumor-promoting role [41], a down-regulation of SOD2 in (colon) tumors, however, would be desirable for improving the prognosis for patients [42] and increasing the effects of conventional anti-cancer therapies, such as radiation or chemotherapeutics [43].

SOD enzymes work in conjunction with H₂O₂-removing enzymes, such as CAT [2]. This tight regulation was indirectly confirmed by (almost) significant correlations between the individual expression ratios of CAT and SOD2 protein in colon tissue after butyrate treatment. Although CAT mRNA and protein have been increased by butyrate, the catalytic activity remained unchanged in normal colon epithelium. In contrast, Yano and Tierney [44] as well as Sauer *et al.* [15] demonstrated an increase in CAT activity after butyrate application in rat smooth muscle cells and primary human colon epithelial cells that might be linked to a decrease of H₂O₂-initiated DNA damage, as observed by Rosignoli *et al.* [45] in isolated human colonocytes and HT29 colon cancer cells. In our study, preliminary investigations related to functional consequences failed to show any protective effect towards H₂O₂-induced genotoxicity, probably due to the absence of an increase in CAT activity after 12 h butyrate incubation. A decisive factor in this context seems to be the incubation period with the SCFA. Studies by Sauer *et al.* [15] and Rosignoli *et al.* [45] showed a

maximum increase in CAT activity and reduction of H₂O₂-induced DNA damage after much shorter incubation times (2 h and 15 min, respectively), pointing to a transient influence of butyrate in the gut. Indeed, after 8 h, the increase in CAT activity was less pronounced as compared to the effect observed after 2 h butyrate exposure [15]. Accordingly, a continuous consumption of fiber-rich foods appears to play an important role in the prolonged up-regulation of CAT activity *in vivo*.

Due to the limited number of samples and large variation range, the incubation of adenoma and tumor colon samples with butyrate yielded no significant outcome. Nevertheless, as partly shown by our study and that from Stein *et al.* [46], transformed colon cells respond to butyrate by up-regulating CAT expression and/or activity. An increase of CAT activity seems to be desirable since the H₂O₂-mediated process of metastasis might be stopped or at least slowed down [47].

Besides the regulatory influence of butyrate on gene expression, this study assessed the correlation between mRNA, protein and activity levels of antioxidant enzymes. Although an overall relationship between gene and protein expression is undisputed, in many cases gene expression is solely not a reliable parameter to predict the level of the corresponding protein [48]. This lack of correlation was also shown for CAT in colon tumor tissue in the present study. A significant relationship between both parameters, in contrast, could be demonstrated for SOD2 in malignant colon tumors, which is similar to the results of Chen *et al.* [49] investigating the cytosolic variant of SOD (SOD1) in lung adenocarcinoma. After butyrate treatment, for none of the enzymes, a significant correlation between the gene and protein expression ratios could be identified; only for CAT, a tendency was recognized. However, when using the median expression values, significant correlations were identified for both enzymes, indicating that possibly the low number of tissue samples might be a limiting factor for the identification of significant associations. These results suggest that the expression of CAT protein is likely to be regulated at the transcriptional level or via an enhancement of CAT mRNA stability in colon tissues. An other important factor influencing correlations might be the use of human tissue samples, especially tumor samples which are composed of different proportions of malignant and non-malignant cells [50]. Since gene and protein expression analyses are only feasible by using different tissue strips of the same sample, deviations between the results are not surprising. With regard to this, Bryant *et al.* [51] showed that the effect of non-responding cells in a heterogeneous cell population, such as peripheral mononuclear blood cells, can dilute or obscure the detection of expression changes in an individual cell type depending on the gene of interest. Complex biological processes, such as

posttranscriptional and posttranslational modifications, protein complex formation, mRNA secondary structures or different biological or experimental mRNA and protein half-lives are further factors that might affect the relative mRNA and protein ratios of different genes to various degrees [48,52]. During H₂O₂ exposure, CAT mRNA, for example, is stabilized through p38 mitogen-activated protein kinase, resulting in the up-regulation of the antioxidant enzyme [53]. Furthermore, CAT is phosphorylated at specific tyrosine residues by members of the Abelson family [54]. A decrease of SOD2 activity can occur in response to peroxynitrite, a reactive nitrogen species, inducing nitration of the protein [55]. Additionally, culture conditions, duration of butyrate exposure or the choice of technological methods may also influence results. In conclusion, this study demonstrated potential chempreventive activity of butyrate on human colon epithelial cells besides previous studies using predominantly cancer cell lines. Nevertheless, consequences resulting from this modulation and the underlying mechanisms need to be fully evaluated, prospectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the German Research Foundation (PO 284/8-3). Moreover, we are grateful to Esther Woschee and Theresia Stier for their assistance during the experimental phase as well as Dr. Duncan Wilson for reading the manuscript. In addition, we thank all donors of tissue samples for giving their informed consent.

REFERENCES

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
2. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266:37-56.
3. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 2007;74:324-329.
4. Mates JM and Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 1999;4:D339-D345.
5. de Moreno de LA, LeBlanc JG, Perdigon G et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J Med Microbiol* 2008;57:100-105.
6. Sengottuvelan M, Senthilkumar R, Nalini N. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1175-1183.
7. Janssen AM, Bosman CB, Kruidenier L et al. Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:327-335.
8. Maffei F, Angeloni C, Malaguti M et al. Plasma antioxidant enzymes and clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk. *Mutat Res* 2011;714:88-92.
9. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. *Globocan 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. 2010;
10. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008;25:2097-2116.
11. Borowicki A, Stein K, Scharlau D et al. Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Nutrition* 2010;103:360-369.
12. World Cancer Research Fund/American Institute of Cancer Research. Systematic literature review. Continuous update project report. The associations between food, nutrition, physical activity and the risk of colorectal cancer. www.dietandcancerreport.org/index.php 2011;
13. Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 2002;132:1012-1017.
14. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J et al. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 2005;26:1064-1076.
15. Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* 2007;18:736-745.
16. Jahns F, Wilhelm A, Jablonowski N et al. Butyrate suppresses mRNA increase of osteopontin and cyclooxygenase-2 in human colon tumor tissue. *Carcinogenesis* 2011;32:913-920.
17. Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J et al. Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol* 2003;41:655-664.
18. Rogler G, Daig R, Aschenbrenner E et al. Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest* 1998;78:889-890.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
20. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
21. Wilhelm A, Jahns F, Bocker S, Mothes H, Greulich KO, Gleis M. Culturing explanted colon crypts highly improves viability of primary non-transformed human colon epithelial cells. *Toxicology In Vitro* 2011;26:133-141.

22. Gleis M, Kirmse A, Habermann N, Persin C, Pool-Zobel BL. Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutrition and Cancer* 2006;56:182-192.
23. Tice RR, Agurell E, Anderson D et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-221.
24. Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czacot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol* 2009;56:663-670.
25. Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2000;17:107-112.
26. Van Driel BE, Lyon H, Hoogenraad DC, Anten S, Hansen U, Van Noorden CJ. Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. *Free Radic Biol Med* 1997;23:435-444.
27. Beno I, Staruchova M, Volkovova K, Batovsky M. Increased antioxidant enzyme activities in the colorectal adenoma and carcinoma. *Neoplasma* 1995;42:265-269.
28. Ozturk HS, Karaayvaz M, Kacmaz M, Kavutcu M, Akgul H, Durak I. Activities of the enzymes participating in purine and free-radical metabolism in cancerous human colorectal tissues. *Cancer Biochem Biophys* 1998;16:157-168.
29. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:403-406.
30. Cable S, Keller JM, Colin S et al. Peroxisomes in human colon carcinomas. A cytochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992;62:221-226.
31. Ahn J, Nowell S, McCann SE et al. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1217-1222.
32. Sutton A, Imbert A, Igoudjil A et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:311-319.
33. Fernandez-Pachon MS, Berna G, Otaolaurruchi E, Troncoso AM, Martin F, Garcia-Parrilla MC. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. *J Agric Food Chem* 2009;57:6578-6583.
34. Pannuru P, Vaddi DR, Kindinti RR, Varadacharyulu N. Increased erythrocyte antioxidant status protects against smoking induced hemolysis in moderate smokers. *Hum Exp Toxicol* 2011;30:1475-1481.
35. Kasapoglu M and Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001;36:209-220.
36. Kasapovic J, Pejic S, Todorovic A, Stojiljkovic V, Pajovic SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct* 2008;26:723-730.
37. Alexandrova ML and Bochev PG. Reduced extracellular phagocyte oxidative activity, antioxidant level changes and increased oxidative damage in healthy human blood as a function of age. *Age (Dordr)* 2009;31:99-107.
38. Fujimoto H, Kobayashi H, Ohno M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Circ J* 2010;74:353-360.
39. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9782-9787.
40. Orchel A, Gruchlik A, Weglarz L, Dzierzewicz Z. Influence of sodium butyrate on antioxidative enzymes activity in Caco-2 cell lines. *Acta Pol Pharm* 2006;63:441-442.
41. Hileman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;53:209-219.
42. Janssen AM, Bosman CB, Sier CF et al. Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1998;78:1051-1057.
43. Kuninaka S, Ichinose Y, Koja K, Toh Y. Suppression of manganese superoxide dismutase augments sensitivity to radiation, hyperthermia and doxorubicin in colon cancer cell lines by inducing apoptosis. *Br J Cancer* 2000;83:928-934.
44. Yano S and Tierney DF. Butyrate increases catalase activity and protects rat pulmonary artery smooth muscle cells against hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:1143-1148.

45. Rosignoli P, Fabiani R, De BA et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1675-1680.
46. Stein K, Borowicki A, Scharlau D, Gleit M. Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells. *Br J Nutr* 2010;104:1101-1111.
47. Goh J, Enns L, Fatemie S et al. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC Cancer* 2011;11:191-
48. Guo Y, Xiao P, Lei S et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40:426-436.
49. Chen G, Gharib TG, Huang CC et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:304-313.
50. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
51. Bryant PA, Smyth GK, Robins-Browne R, Curtis N. Detection of gene expression in an individual cell type within a cell mixture using microarray analysis. *PLoS One* 2009;4:e4427-
52. Maier T, Guell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 2009;583:3966-3973.
53. Sen P, Chakraborty PK, Raha S. p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) upregulates catalase levels in response to low dose H₂O₂ treatment through enhancement of mRNA stability. *FEBS Lett* 2005;579:4402-4406.
54. Cao C, Leng Y, Liu X, Yi Y, Li P, Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochemistry* 2003;42:10348-10353.
55. Yamakura F and Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:318-325.

FIGURE LEDGENDS

Figure 1. Basal SOD2 and CAT expression in differently transformed human colon tissues derived from individual colon cancer patients. Transcript levels of both antioxidant enzymes were analyzed using qPCR; protein levels were quantified in the same set of donors using Western blot. (A) Relative *SOD2* mRNA levels in paired normal (filled circles), adenoma (open squares) and/or tumor (filled triangles) colon samples. (B) Representative example blot of SOD2 protein expression in paired normal (N), adenoma (A) and tumor (T) colon tissue of an individual donor. β -actin served as internal loading control. (C) Relative SOD2 protein expression in paired normal (filled circles), adenoma (open squares) and/or tumor (filled triangles) colon samples. (D-F) Relative *CAT* mRNA and protein expression levels were analogously determined in the same tissue samples. In panels A, C, D and F data are listed by age of the patients (P) in ascending order; sex is indicated by lowercase (m, male; f, female). One patient was found with 2 tumors (T1, T2), only one of which provided evaluable protein expression data. For better visualization, mRNA and protein levels in normal and tumor samples were each connected by a line.

Figure 2. Impact of butyrate on SOD2 expression in differently transformed human colon tissues. (A) Relative mRNA levels of SOD2 (filled triangles) were determined after butyrate application (10 mM, 12 h) in matched normal, adenoma and/or tumor colon tissues derived from individual colon cancer patients (P) using qPCR and compared to the respective medium controls (shown as dotted line) which were set to 1. (B) Relative SOD2 protein levels were analyzed after butyrate application (10 mM, 12 h) in matched normal, adenoma and/or tumor colon tissues using Western blot and compared to the respective medium controls (shown as dotted line) which were set to 1. For protein expression analyses, the same set of patients (P) was used. In addition, representative example blots are shown for each tissue type. Results in A and B are listed by age of the donors in ascending order. Sex is indicated by lowercase (m, male; f, female). One patient (P10) was found with two tumors (T1, T2).

Figure 3. Impact of butyrate on CAT expression in differently transformed human colon tissues. (A) Relative mRNA levels of CAT (filled triangles) after butyrate application (10 mM, 12 h) in matched normal, adenoma and/or tumor colon tissues compared to the respective medium controls (shown

as dotted line) which were set to 1. (B) Relative CAT protein expression (filled triangles) in matched normal, adenoma and/or tumor colon tissues compared to the respective medium controls (shown as dotted line) which were set to 1. For details, please see description of figure 2.

Figure 4. SOD2 activity in human colon tissues. The enzymatic activity of the mitochondrial isoform was measured in cell extracts using a commercially available SOD assay kit with the addition of 3 mM sodium cyanide. (A) Basal SOD2 activity in paired normal (filled circles), adenoma (open squares) and/or tumor (filled triangles) colon tissue of individual donors. Data are arranged according to age of the patients (P) which is complemented by their sex (m, male; f, female). One donor (P10) had 2 tumors (T1, T2). For better visualization, activity levels in normal and cancer tissue were each connected by a line. (B) Age dependency of SOD2 activity in normal colon tissue. Each filled circle represents thereby one individual. (C-D) Fold changes in SOD2 activity in normal, adenoma and tumor colon tissues after application of butyrate (10 mM, 12 h). Medium controls were set to 1 and are indicated by dotted lines. In addition to the remaining samples of the original set of patients (filled triangles), tissue specimens of 8 further patients (open circles) with colorectal cancer or polyposis (P17) were included. Among them P14 was found with 2 tumors (T1, T2). For more details, please refer to figure 4A.

Figure 5. CAT activity in human colon tissues. The catalytic activity of the H₂O₂ degrading enzyme was measured spectrophotometrically in cytosolic extracts by the method of Aebi [20] and normalized to the total protein content. (A) Basal CAT activity in paired normal (filled circles), adenoma (open squares) and/or tumor (filled triangles) colon samples. Data are arranged according to age of the patients (P) which is complemented by their sex (m, male; f, female). One donor (P10) had 2 tumors (T1, T2). For better visualization, activity levels in normal and cancer tissue were each connected by a line. (B) Correlation of CAT activity in normal colon epithelial cells with the age of donors. Each filled circle corresponds to one individual. (C) Changes in CAT activity (filled triangles) after butyrate exposure (10 mM, 12 h) relative to the medium control (filled squares) which was set to 1. Data are arranged according to age of the patients (P) which is complemented by their sex (m, male; f, female). P10 was found with 2 Tumors, indicated by T1 and T2.

Figure 1

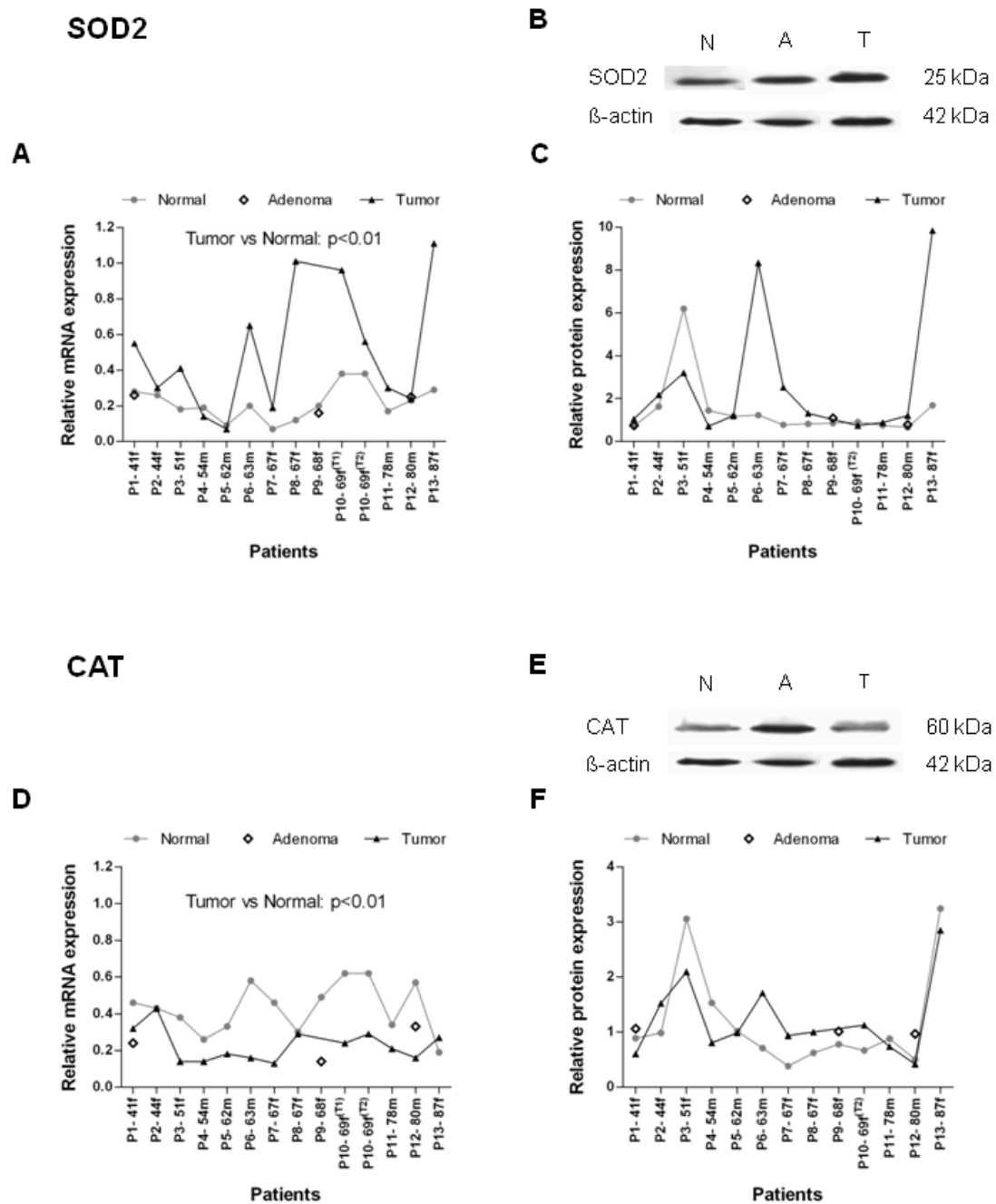
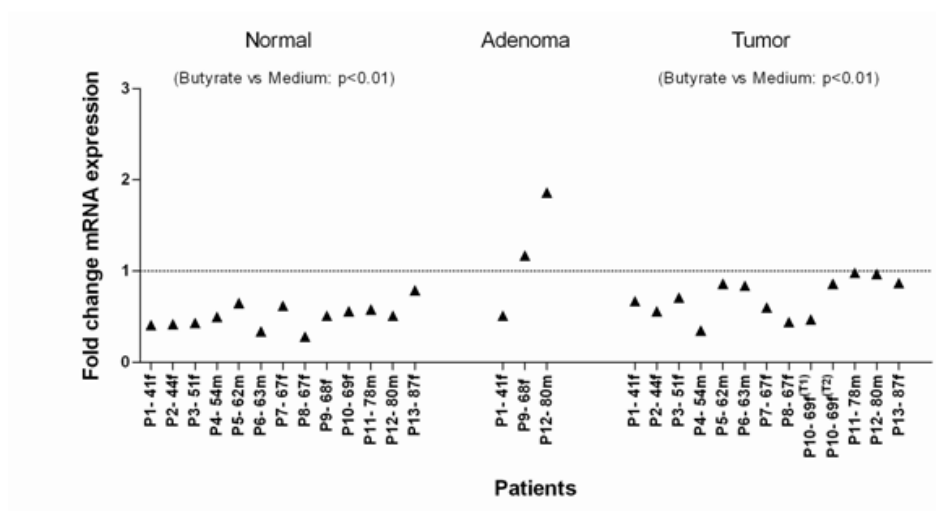


Figure 2

A SOD2 mRNA



B SOD2 protein

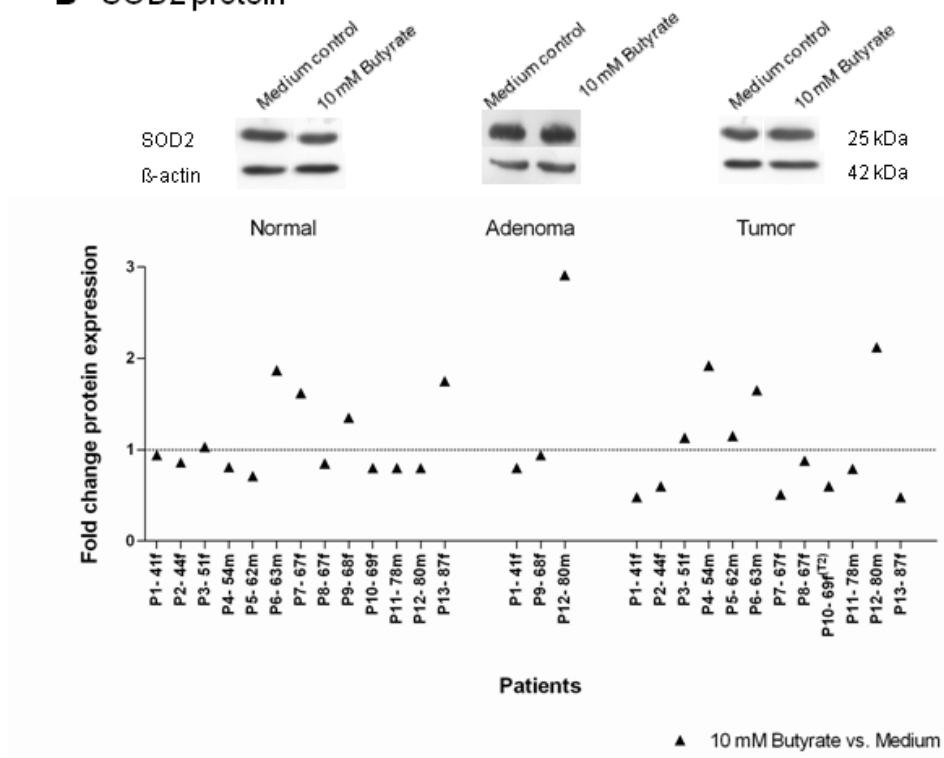
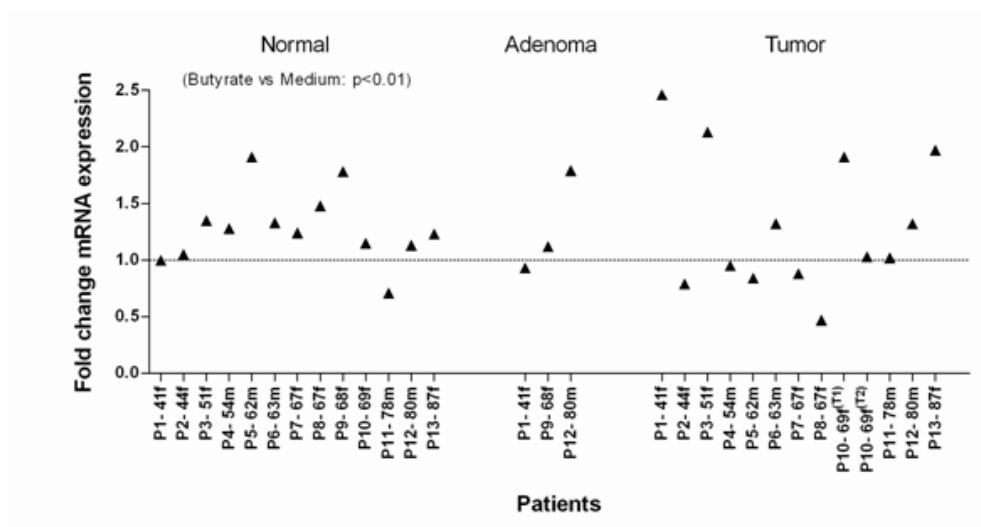


Figure 3

A CAT mRNA



B CAT protein

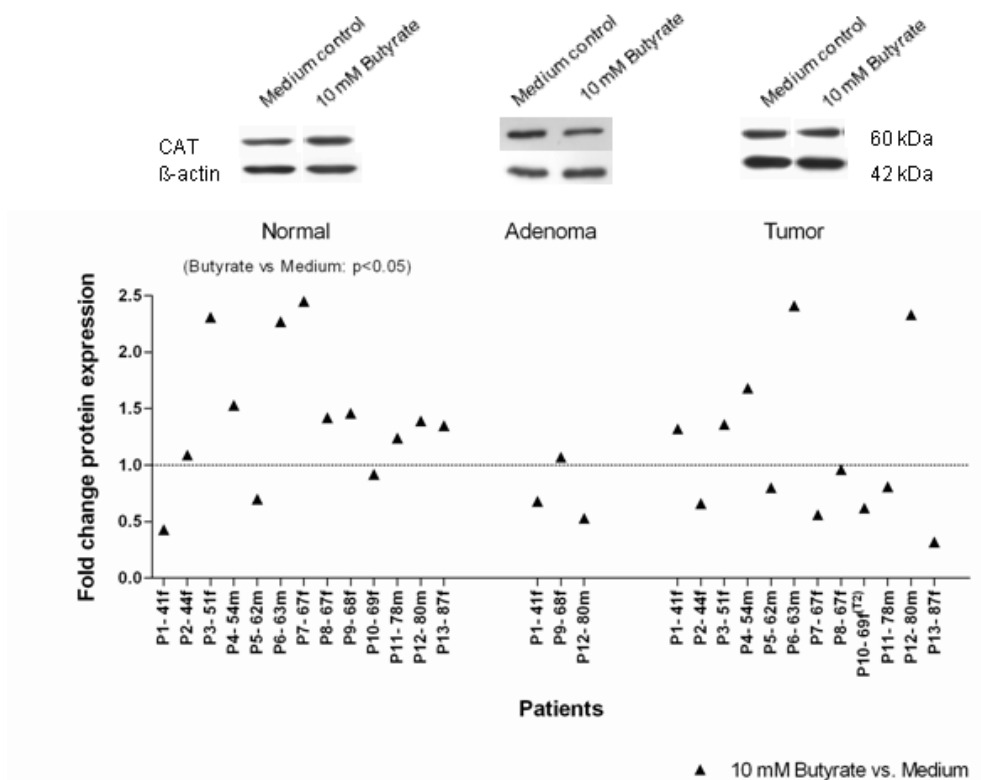


Figure 4

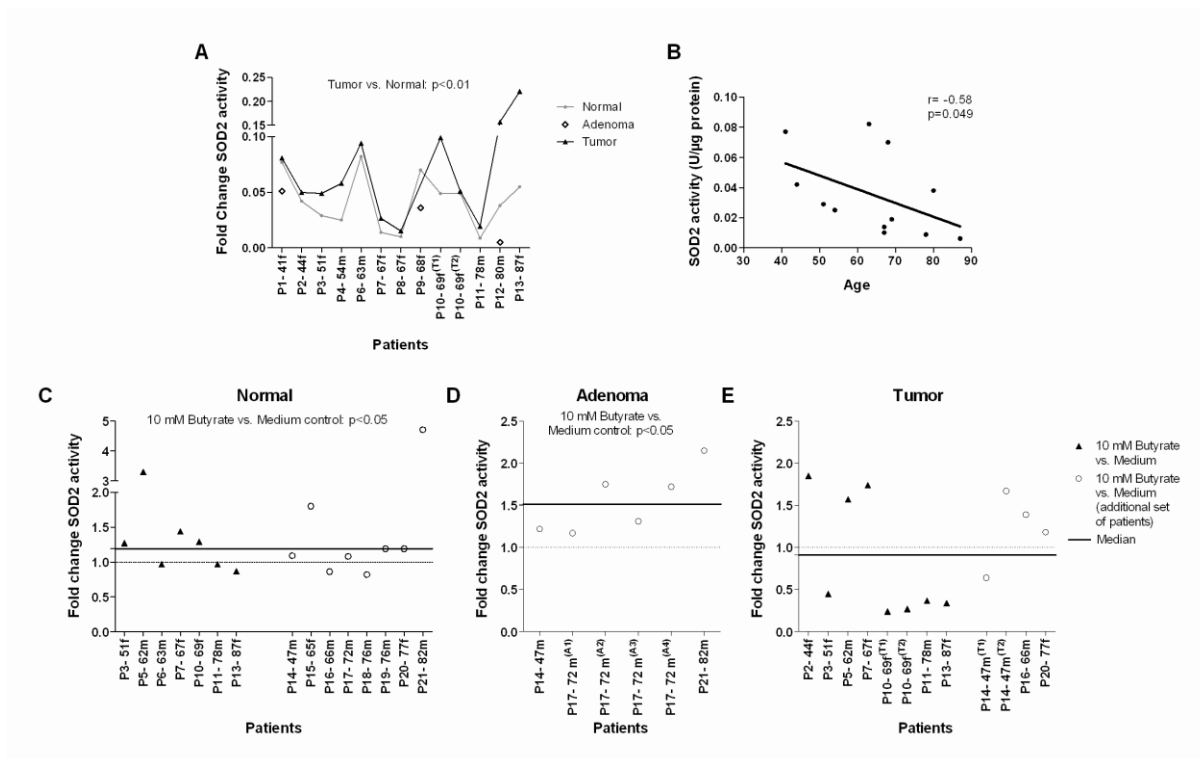
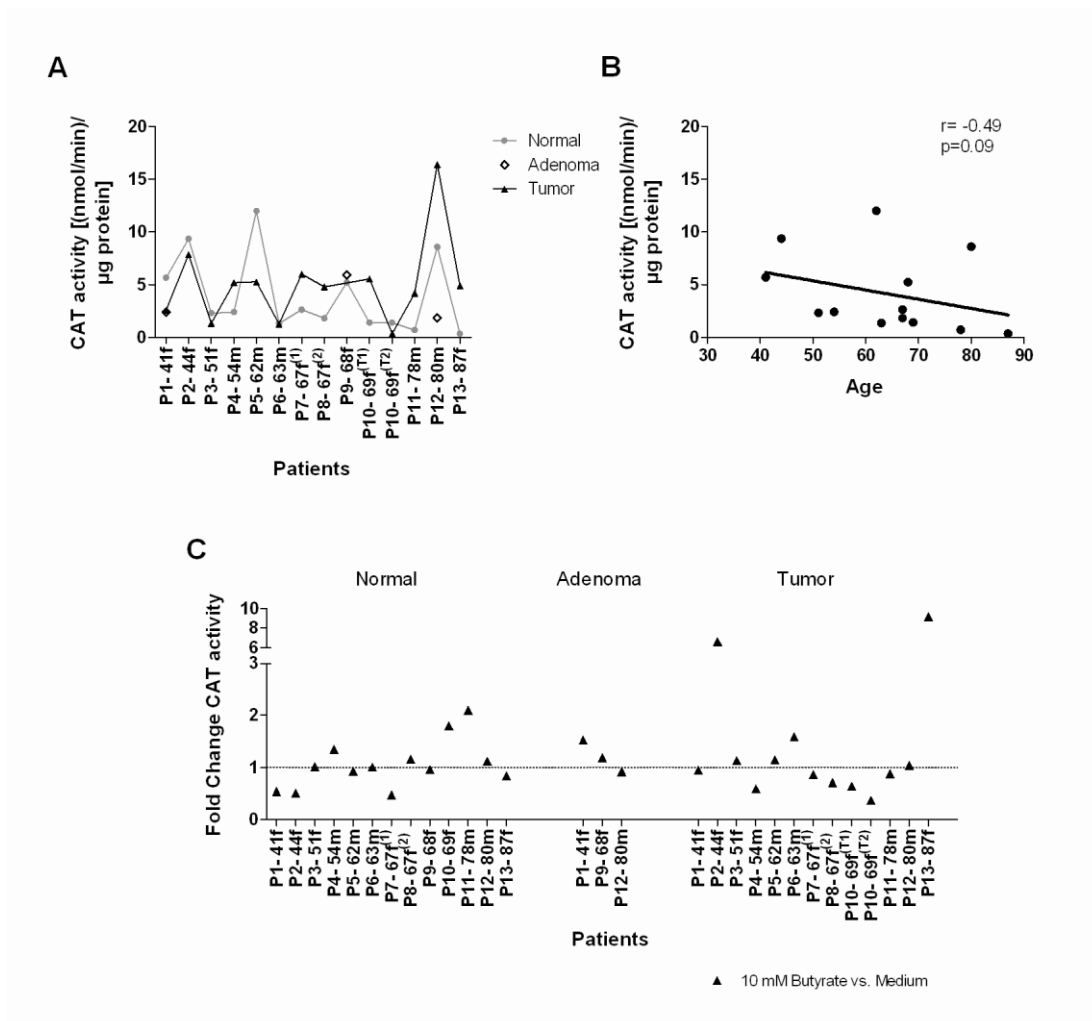


Figure 5



3 Weitere Ergebnisse

3.1 Veränderung des SCFA-Profiles nach In-vitro-Fermentation von Synergy1®

Im Unterschied zu Butyrat als Einzelsubstanz werden bei der bakteriellen Fermentation im Dickdarm weitere Metaboliten gebildet, weshalb die Verwendung von komplex zusammengesetzten Ballaststoffen besser den physiologischen Gegebenheiten entspricht. Um diese Polymere für In-vitro-Untersuchungen zugänglich zu machen, erfolgte die Herstellung eines sogenannten Fermentationsüberstandes (FÜ), der das Resultat eines *in vitro* durchgeführten Verdauungsprozesses und einer anschließenden Zentrifugation zur Abtrennung der nicht-wasserlöslichen Bestandteile darstellt. Die Verdauungssimulation des in dieser Arbeit verwendeten Kohlenhydrates Synergy1® wurde dabei unter Anwendung des von Stein *et al.* ⁽²¹⁴⁾ entwickelten „batch culture“ Modells mit geringfügigen Änderungen von Lux *et al.* ⁽²¹⁵⁾ bezüglich der eingesetzten Synergy1®-Fermentationsmenge und dem Gehalt an Gallensäuren im intestinalen Extrakt durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Synergy1®, der nur Fermentationspuffer enthielt (Leerkontrolle bzw. Blank).

Die resultierenden FÜs wurden nachfolgend u. a. einer gaschromatographischen Analyse (AG Prof. Jahreis, Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Bestimmung ihres SCFA-Profiles unterzogen (Tab. 1). Hierbei zeigte sich eine Zunahme der SCFA-Gesamtmenge nach der In-vitro-Fermentation von Synergy1® (112 mM) im Vergleich zum Blank (32 mM), die mit einem signifikant vermindertem pH-Wert einherging (pH Syn1 vs. Blank: $4,58 \pm 0,26$ vs. $6,53 \pm 0,05$, t-Test: $p < 0,01$) ⁽²¹⁵⁾. Zudem war eine Verschiebung der molaren Verhältnisse der SCFAs zugunsten der Bildung von Azetat und Butyrat zu beobachten ⁽²¹⁵⁾. Die in dieser Arbeit verwendeten FÜs wurden in Zusammenarbeit mit Lux *et al.* ⁽²¹⁵⁾ im Rahmen anderweitiger Untersuchungen generiert, deren Ergebnisse bereits publiziert sind.

Tab. 1: Konzentrationen und molare Verhältnisse von SCFAs im Fäzeskontroll (Blank)- und Synergy1®-Fermentationsüberstand (Syn1) nach In-vitro-Fermentation ⁽²¹⁵⁾

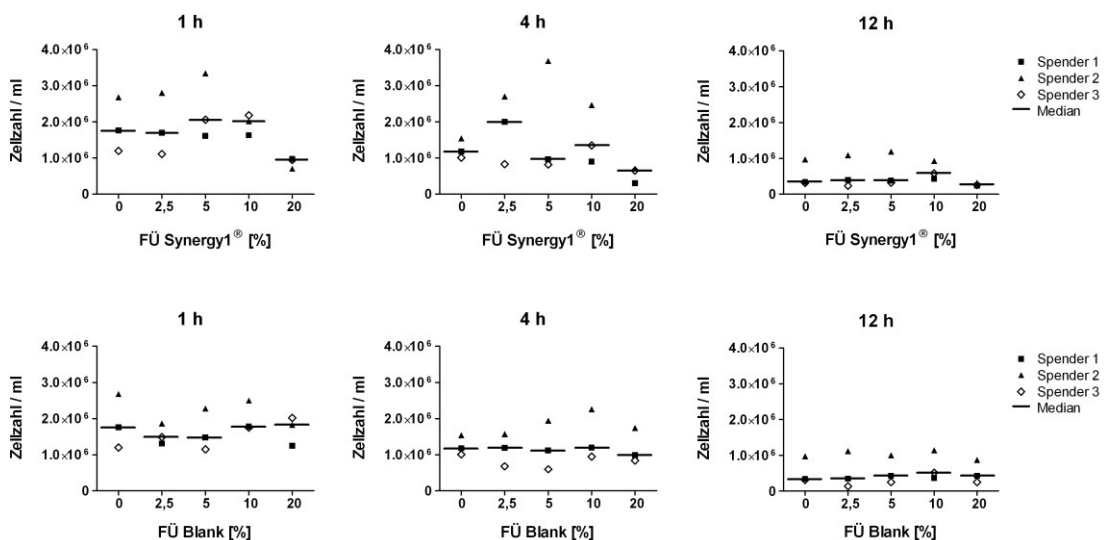
		SCFA							
		Azetat	Propionat	i-Butyrat	n-Butyrat	i-Valeriat	n-Valeriat	Capronat	Gesamt
Syn1	mmol/l	70,7	8,8	0,7	28,0	0,9	2,1	0,8	112,0
	%	63,1	7,9	0,6	25,0	0,8	1,9	0,7	100,0
Blank	mmol/l	16,3	6,1	1,2	5,0	1,8	1,3	0,5	32,2
	%	50,6	19,0	3,7	15,5	5,6	4,0	1,6	100,0
Syn1/ Blank		4,3	1,4	0,6	5,6	0,5	1,6	1,6	
%Syn1/ %Blank		1,2	0,4	0,2	1,6	0,1	0,5	0,4	

3.2 Zytotoxizität von *in vitro* fermentiertem Synergy1®

Die Ermittlung des subtoxischen Konzentrationsbereiches der FÜs für primäre Kolonepithelzellen wurde unter Verwendung des Trypanblauausschlusstests durchgeführt. Der Test beruht auf der Membranintegrität intakter Zellen, die für den Farbstoff undurchlässig sind. Tote oder geschädigte Zellen hingegen akkumulieren den Farbstoff und werden dadurch dunkelblau gefärbt. Für den Test wurden die Zellen des normalen Kolonepithels zunächst mit Hilfe eines enzymatischen Verdau (Proteinase K, Collagenase P) vereinzelt und anschließend mit den FÜs (0-20 %) über einen Zeitraum von 1-12 h bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse zeigten eine zeitabhängige Abnahme der Zellzahl als Folge der In-vitro-Kultivierung. Während diese nach 12 h nur noch etwa 10 % der ursprünglich eingesetzten Zellzahl (0 h) betrug (Abb. 3A), sank die Vitalität der Zellen im Vergleich nur um maximal 22 % (Abb. 3B). Die FÜs des *in vitro* fermentierten Kohlenhydrates Synergy1® und des dazugehörigen Kontrollansatzes (Blank) führten dabei unabhängig von der eingesetzten Konzentration zu keiner zusätzlichen Veränderung der Anzahl der Zellen über die gesamte Inkubationsdauer (1-12 h) (Abb. 3A). Gleichermäßen unbeeinflusst blieb die Vitalität der Kolonzellen mit Ausnahme derjenigen, die der höchsten Konzentration (20 %) des FÜ Synergy1® exponiert waren (Abb. 3B). Die Ergebnisse weisen im Vergleich zur geringsten Konzentration auf eine signifikant reduzierte Vitalität (1 h) hin und damit möglicherweise auf eine zytotoxische Wirkung des FÜ Synergy1® in Konzentrationen von mehr als 10 %.

Beide Parameter wurden darüber hinaus auch nach 2 h Inkubation mit den FÜs bestimmt. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen 1 und 2 h wurde jedoch auf eine Darstellung der Daten zur Zellzahl und Vitalität nach 2 h verzichtet.

A



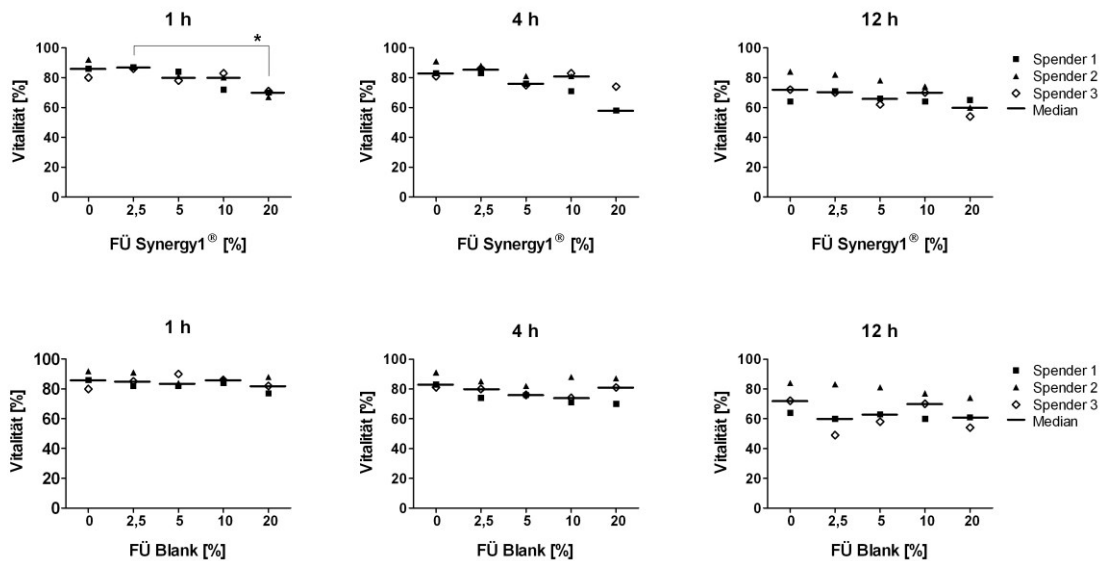
B


Abb. 3: Zytotoxizität des Synergy1®- und Fäzeskontrollüberstandes (Blank) in normalen Kolonzellen nach 1, 4 und 12 h. Primäre Kolonepithelzellen von drei individuellen Spendern wurden nach ihrer Vereinzelung mit Fermentationsüberständen (FÜs) des Kohlenhydrates Synergy1® und der Kontrolle in Konzentrationen von 0-20 % für die angegebenen Zeiträume behandelt. (A) Zellzahl und (B) Vitalität wurden anschließend mittels des Trypanblauausschlusstests bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen der FÜs wurden mit Hilfe des Friedman-Tests ermittelt: * $p < 0,05$.

3.3 Basale Expression der GST-Isoformen P1 und M2 sowie GST-Gesamtaktivität in normalem und malignem Kolongewebe

GSTs besitzen aufgrund ihrer Entgiftungsfunktion eine große Bedeutung für den Schutz von Geweben vor toxischen oder karzinogenen Einflüssen ⁽²¹⁶⁾. Mittels Real-time PCR, Western Blot und einem GST-Aktivitätsassay (nach Habig *et al.* ⁽²¹⁷⁾) wurde zunächst untersucht, wie sich die mRNA- und Proteinexpression der *GSTP1* und *GSTM2* sowie die Gesamtaktivität während der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Tumore verändert. Hierfür standen insgesamt 11 gepaarte Normal- und Tumorgewebeproben zur Verfügung, die aufgrund ihres z. T. geringen Probenvolumens nur in einer begrenzten Anzahl der Fälle eine gleichzeitige Analyse mehrerer Parameter (mRNA, Protein, Aktivität) ermöglicht haben. Bei den Geweben handelt es sich um Resektionsmaterial, für dessen wissenschaftliche Verwendung die Patienten zuvor ihr ausdrückliches Einverständnis erklärt hatten. Ein Patient wies dabei neben einem malignen Tumor drei Polypen bzw. Adenome auf, die ebenfalls partiell in die Untersuchungen (Protein, Aktivität) einbezogen wurden. Die Genexpressionsanalysen (qPCR) zeigten eine median 1,31-fach erhöhte *GSTP1*-Transkriptmenge in den Kolontumorproben im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe ($p=0,07$), während die mRNA-Expression der *GSTM2* tendenziell

vermindert war (median 0,38-fach, $p=0,08$) (Abb. 4A). Nachfolgende Proteinexpressionsanalysen konnten eine Überexpression der GSTP1 jedoch nicht bestätigen und zeigten median keinen Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe (Fold Change Tumor vs. Normal: 1,03; $p=0,97$; Abb. 4B). Im Unterschied zu GSTP1, welche die Haupt-Isoform in den Kolonozyten repräsentiert, war *GSTM2* im Normalgewebe um mindestens eine Zehnerpotenz geringer exprimiert. Aufgrund der geringen Expressionsmenge und den mitunter niedrigen Gesamtproteinkonzentrationen der Zytosole ergaben sich Schwierigkeiten bei der Detektion des Proteins mittels Western Blot. Die wenigen verfügbaren Ergebnisse lassen bisher keine fundierten Aussagen zu (Abb. 4B). Signifikante Veränderungen der GST-Proteinexpression konnten auch im Adenomgewebe aufgrund der begrenzten Anzahl an Proben nicht verzeichnet werden. Folglich wurden ebenso keine Unterschiede zwischen der GST-Gesamtaktivität in allen drei Gewebetypen gefunden ($p>0,05$; Abb. 4C). Dennoch wiesen drei der vier Adenome eine leicht erhöhte Aktivität im Vergleich zum dazugehörigen Normalgewebe auf, während das maligne Gewebe konträre Ergebnisse zeigte. Bei sechs der neun untersuchten Patienten wurde median eine 23 % geringere GST-Gesamtaktivität im Tumorgewebe gemessen als im normalen Darmepithel. Diese Abnahme könnte im Zusammenhang mit der tendenziell verminderten Menge des *GSTM2*-Enzyms stehen, die auf mRNA-Ebene in den gleichen Tumorproben beobachtet worden war. GST-Isoenzyme der Mü-Klasse setzen hierbei bevorzugt 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol, welches als Substrat bei der Reaktion dient, um ⁽¹⁵³⁾.

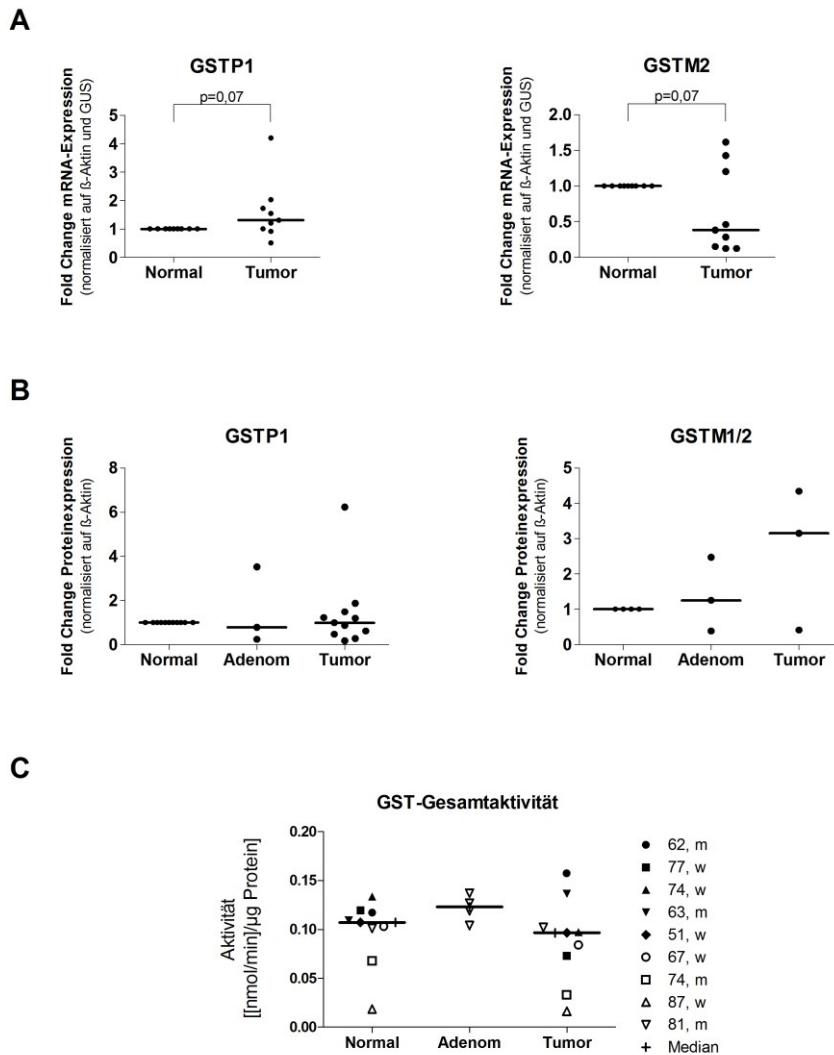


Abb. 4: Basale Expression der GSTP1 und GSTM2 sowie Gesamtaktivität von GSTs im Kolongewebe individueller Spender. Die (A) mRNA-Expression der einzelnen Isoenzyme wurde unter Verwendung genspezifischer Primer mittels qPCR in gepaartem Normal- und Tumorgewebe ($n=9$ Spender) ermittelt (GUS, β -Glucuronidase). Der (B) Nachweis der korrespondierenden Proteine erfolgte mittels Western Blot ($n=11$ bzw. 3 Spender). Die Ergebnisse beider Untersuchungen wurden jeweils als vielfache Veränderung im Vergleich zu den jeweiligen Normalgeweben (=1) dargestellt (Fold Change; —, mediane Expression). Daraus resultierende (C) Veränderungen des Aktivitätsniveaus wurden anhand der Messung der GST-Gesamtaktivität bestimmt. Die Legende zeigt hierbei das Alter und Geschlecht (w, weiblich; m, männlich) jedes Spenders ($n=9$) an.

3.4 Einfluss von Butyrat und *in vitro* fermentiertem Synergy1® auf die Expression von GSTP1 und GSTM2 sowie die GST-Gesamtaktivität in normalem und malignem Kolongewebe

Die Messung der Expression und/oder Aktivität von GSTs stellt einen wichtigen Parameter zur Charakterisierung des chemopräventiven Potenzials von nahrungsrelevanten oder pharmakologisch wirksamen Substanzen dar ⁽²¹⁶⁾. Butyrat

(10 mM, 12 h) führte im Normalgewebe zu einer Induktion der *GSTP1*-Expression, die jedoch nur auf mRNA-Ebene Signifikanz erlangte (Abb. 5A). Acht von neun untersuchten Spendern im Alter zwischen 51 und 92 Jahren zeigten 1,28-fach bis 1,67-fach erhöhte Transkriptmengen des Phase II-Enzyms (medianer Fold Change aller Spender: 1,46, $p < 0,01$), wobei nur 6 von insgesamt 12 Spendern eine erhöhte Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle (Medium) aufwiesen (medianer Fold Change *GSTP1*-Protein: 1,21, $p = 0,27$; Abb. 5B). Ähnlich wie Butyrat bewirkten auch FÜ Blank und FÜ Synergy1® eine Zunahme der *GSTP1* mRNA-Menge in normalen Kolonepithelzellen (Abb. 5A). Der Anstieg blieb aufgrund der geringen Spenderzahl jedoch ohne statistische Relevanz (medianer Fold Change Blank vs. Medium: 1,27; $p = 0,44$; medianer Fold Change Syn1 vs. Blank: 1,17; $p = 1,00$) und Folgen für die Expression des dazugehörigen Proteins (Abb. 5B). Im Adenom (nur Protein)- und Tumorgewebe konnten weder Butyrat noch FÜ Blank oder Synergy1® eine signifikante Veränderung der *GSTP1*-Expression erzielen (Abb. 5A und B).

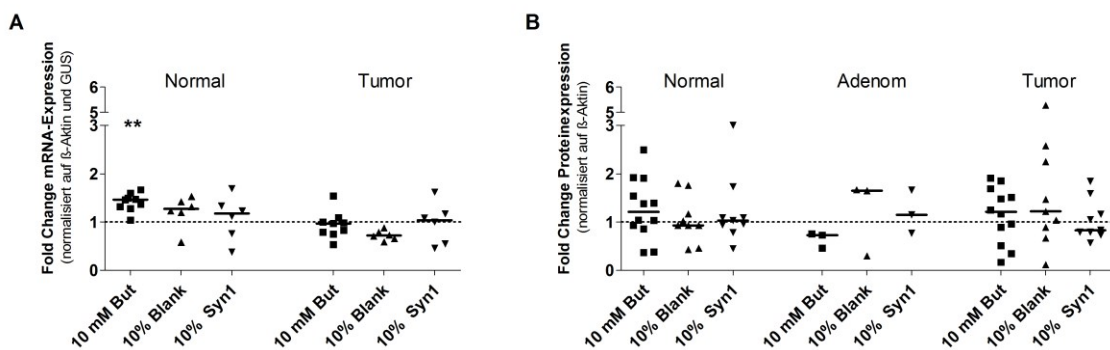


Abb. 5: Einfluss von Butyrat und komplexen Fermentationsüberständen auf die Expression der *GSTP1* in verschiedenen transformierten Kolongeweben. Die (A) mRNA-Expression der *GSTP1* wurde nach Behandlung (12 h) der gepaarten Normal- und Tumorgewebeprobe(n) ($n = 9$ Spender) mit Butyrat (10 mM), FÜ Blank (10 %) und FÜ Synergy1® (10 %) unter Verwendung genspezifischer Primer mittels qPCR erfasst (GUS, β -Glucuronidase). Die (B) Expression des *GSTP1*-Proteins wurde hingegen nach der Behandlung (12 h) mit den angezeigten Substanzen mittels Western Blot charakterisiert. Für die Analyse wurden Gewebeprobe(n) der gleichen Spender ($n = 9$) und die dreier weiterer Patienten genutzt. Bei einem Kolonkrebspatienten wurden neben einem Karzinom noch drei Polypen bzw. Adenome entdeckt. Die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpressionsanalysen wurden jeweils als vielfache Veränderung im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (=1, gestrichelte Linie) dargestellt (Fold Change). Für die mit Butyrat bzw. FÜ Blank behandelten Gewebe diente jeweils ein Ansatz mit Medium als Kontrolle, während für die mit FÜ Synergy1®-inkubierten Gewebe FÜ Blank als Referenz genutzt wurde. Die schwarzen, horizontalen Striche kennzeichnen jeweils den medianen Fold Change (But, Butyrat; Blank, Fermentationsüberstand des Blank; Syn1, Fermentationsüberstand von Synergy1®; Wilcoxon matched pairs test: 10 mM Butyrat vs. Medium: $**p < 0,01$).

Die Genexpression des GST-Isoenzym *M2* wurde sowohl im Normalgewebe als auch im malignen Gewebe des Kolons durch Butyrat moduliert (Abb. 6). Beide Gewebe reagierten mit einem signifikanten Anstieg der Transkriptmenge auf die Behandlung (mediane Fold Changes: 1,47 (Normal, $p=0,01$) und 1,77 (Tumor, $p=0,03$); Abb. 6A). Eine ähnliche, aber insignifikante Induktion konnte auch auf Proteinebene des Enzyms beobachtet werden (mediane Fold Changes: 1,67 (Normal, $p=0,22$); 1,33 (Tumor, $p=0,25$); Abb. 6B). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass der zur Immundetektion verwendete Primärantikörper neben GSTM2 auch die Isoform M1 erkennt. Aufgrund der geringen Spenderzahl bleiben die Veränderungen des GSTM-Proteinniveaus vorerst jedoch ohne Relevanz. Im Unterschied zu Butyrat zeigten weder FÜ Blank noch Synergy1® einen signifikanten Einfluss auf die Expression von GSTM2 in beiden Kolongeweben (Abb. 6A und B). Lediglich die Applikation des FÜ Blank führte im Normalgewebe mehrheitlich (5/6) zu einer Zunahme an *GSTM2*-Transkripten ($p=0,31$). Für die Adenomgewebeproben konnten bisher keine verwertbaren Ergebnisse generiert werden.

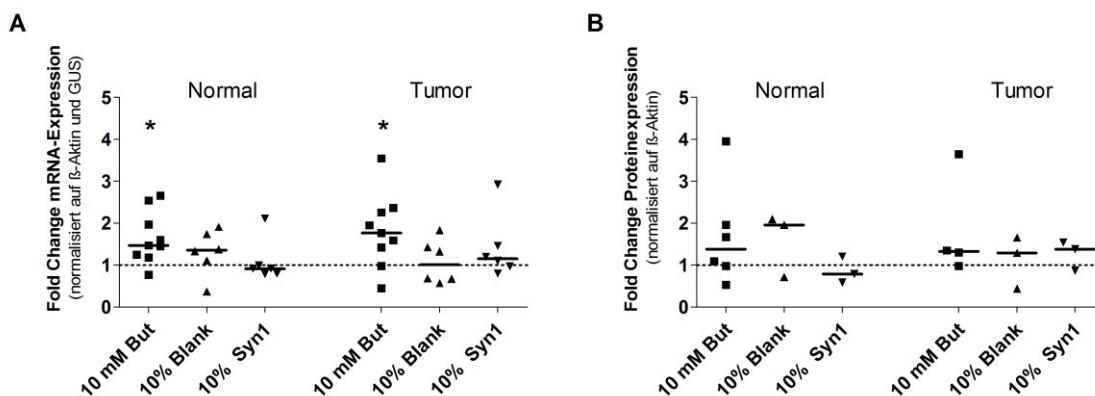


Abb. 6: Einfluss von Butyrat und komplexen Fermentationsgemischen auf die Expression von GSTM2 in verschiedenen transformierten Kolongeweben. Die (A) mRNA-Expression der *GSTM2* wurde nach Behandlung (12 h) der gepaarten Normal- und Tumorgewebe mit Butyrat (10 mM), FÜ Blank (10 %) und FÜ Synergy1® (10 %) unter Verwendung genspezifischer Primer mittels qPCR erfasst (GUS, β -Glucuronidase). Die (B) Expression des dazugehörigen Proteins wurde hingegen mit Hilfe eines weniger spezifischen Primärantikörpers detektiert, der neben *GSTM2* auch *GSTM1* erkennt. Der Nachweis von *GSTM1/M2* konnte unter den gegebenen Bedingungen nur in einem Teil ($n=3-6$) der *ex vivo* behandelten Proben erbracht werden. Sowohl für die mRNA- als auch Proteinexpressionsanalysen wurden mit einer Ausnahme Gewebeproben der gleichen Spender ($n=9$) verwendet. Die Ergebnisse beider Untersuchungen wurden jeweils als vielfache Veränderung (Fold Change) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (=1, gestrichelte Linie) dargestellt. Die mediane Veränderung jeder Behandlung ist durch einen schwarzen, horizontalen Strich angezeigt, während individuelle Reaktionen durch Symbole gekennzeichnet sind (But, Butyrat; Blank, Fermentationsüberstand des Blank; Syn1, Fermentationsüberstand von Synergy1®; Wilcoxon matched pairs test: 10 mM Butyrat vs. Medium: $*p<0,05$).

Zusätzlich zur Gen- und Proteinexpression beider GST-Isoenzyme wurden mögliche Veränderungen der GST-Gesamtaktivität durch die Darmfermentationsprodukte bestimmt. Im Unterschied zu dem beobachteten Anstieg von *GSTP1* und *GSTM2* verminderte Butyrat (10 mM, 12 h) die enzymatische Gesamtaktivität im Normalgewebe (Abb. 7). Der zwar nur marginale Abfall der Aktivität von median 20 % erwies sich jedoch aufgrund des nahezu einheitlich veränderten GST-Aktivitätsmusters (8/10 Spender) als signifikant. Eine gegenteilige Wirkung auf das normale Darmepithel scheint hingegen der komplexe FÜ Synergy1® zu haben. Fünf der insgesamt 7 Normalgewebe, die gegenüber FÜ Synergy1® exponiert gewesen sind, wiesen eine median 11 % höhere, wenngleich nicht signifikante ($p=0,11$), Aktivität auf im Vergleich zu den mit Blank-behandelten Kontrollgeweben. Der Blank selbst sowie Butyrat in einer weiteren Konzentration von 2 mM blieben ohne einen nachweislichen Effekt.

In den gepaarten Tumorgeweben hatte keine der getesteten Verbindungen bzw. Fermentationsüberstände einen signifikanten Effekt auf die GST-Gesamtaktivität (Abb. 7). Lediglich Butyrat (10 mM, 12 h) führte zu einem tendenziellen Anstieg (8/10; medianer Fold Change aller Spender: 1,24, $p=0,1055$) und zeigte damit, möglicherweise unterschiedliche Wirkungen auf beide Gewebearten zu haben. Ähnlich wie Butyrat als Einzelsubstanz, war auch FÜ Synergy1® in der Lage, die GST-Gesamtaktivität in der Mehrzahl der Tumorproben (4/7) zu erhöhen ($p=0,30$). Um diese Unterschiede statistisch zu sichern, werden allerdings mehr Gewebespendere benötigt. Ein Einfluss der Testsubstanzen auf die GST-Gesamtaktivität des prämaligen Adenomgewebes konnte aufgrund der geringen Probenanzahl ebenfalls nicht ermittelt werden.

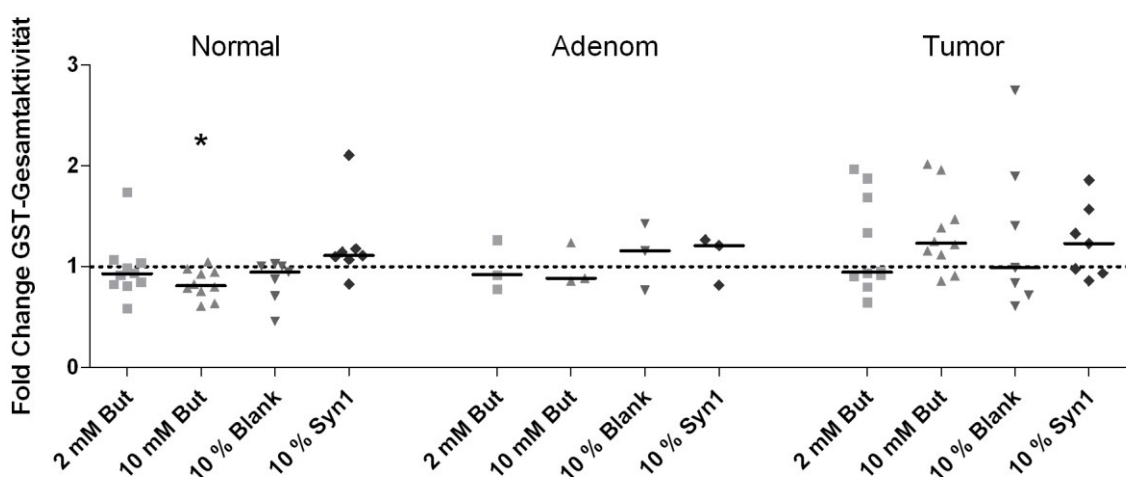


Abb. 7: Einfluss von Butyrat und komplexen In-vitro-Fermentationsüberständen auf die GST-Gesamtaktivität in Tumor- und tumorfreiem Kolongewebe. Gepaartes Normal-, Adenom- und/oder Tumorgewebe von 10 Kolonkrebsspatienten wurde zunächst mit Butyrat (2 und 10 mM), FÜ Blank (10 %) und FÜ Synergy1® (10 %) für 12 h *ex vivo* behandelt. Anschließend erfolgte die

Extraktion des enzymhaltigen Zytosols, welches nachfolgend für die Messung der GST-Gesamtaktivität (mit 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol als Substrat) verwendet wurde. Individuelle Reaktionen auf die Behandlung wurden als vielfache Veränderung (Fold Change) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (=1, gestrichelte Linie) dargestellt und sind durch ein Symbol angezeigt (But, Butyrat; Blank, Fermentationsüberstand des Blank; Syn1, Fermentationsüberstand von Synergy1®; Wilcoxon matched pairs test: 10 mM Butyrat vs. Medium: *p<0,05).

3.5 Einfluss von *in vitro* fermentiertem Synergy1® auf die Gen-Expression von *COX-2*, *OPN*, *PKM2*, *HSP90β* sowie *CAT* und *SOD2* im humanen Kolongewebe

Neben den ausgewählten Isoenzymen der GSTs wurden auch die anderen Gene in dieser Arbeit in Ergänzung zu Butyrat bezüglich ihrer Regulierbarkeit durch den komplexen FÜ des Kohlenhydrates Synergy1® untersucht. Die Anzahl der analysierten Proben war dabei generell von der Verfügbarkeit des Gewebematerials abhängig, welches primär der Erfassung des chemopräventiven Potenzials von Butyrat diente. Die Behandlung (12 h) des Kolongewebes mit FÜ Synergy1® (10 %) hatte überwiegend Effekte zur Folge, die bisher ausschließlich auf mRNA-Ebene der untersuchten Zielgene deutlich wurde (Daten zur Proteinexpression nicht gezeigt). So führte das komplexe Fermentationsgemisch zu einer dem Butyrat vergleichbaren Reduktion der mRNA-Gehalte von *OPN*, *COX-2* und *PKM2*, die im malignen Gewebe partiell Signifikanz erlangte (*COX-2*, *PKM2*) (Abb. 8). Die mRNA-Expression von *HSP90β* wurde weder von Butyrat (mit Ausnahme des Normalgewebes) noch von FÜ Synergy1® signifikant beeinflusst.

Weitere Modulationen ließen sich auch bei antioxidativ wirksamen Proteinen feststellen (Abb. 8). Während die mRNA-Expression des H₂O₂-abbauenden Enzyms *CAT* bei nahezu allen Spendern (8/9) durch FÜ Synergy1® *in vitro* im Normalgewebe erhöht werden konnte, hatte die Behandlung in den gleichen Gewebeproben einen gegenteiligen Effekt auf die Genexpression der mitochondrialen *SOD2*. Eine Abnahme der gleichnamigen Transkriptmenge konnte darüber hinaus auch in den dazugehörigen Tumorgeweben festgestellt werden.

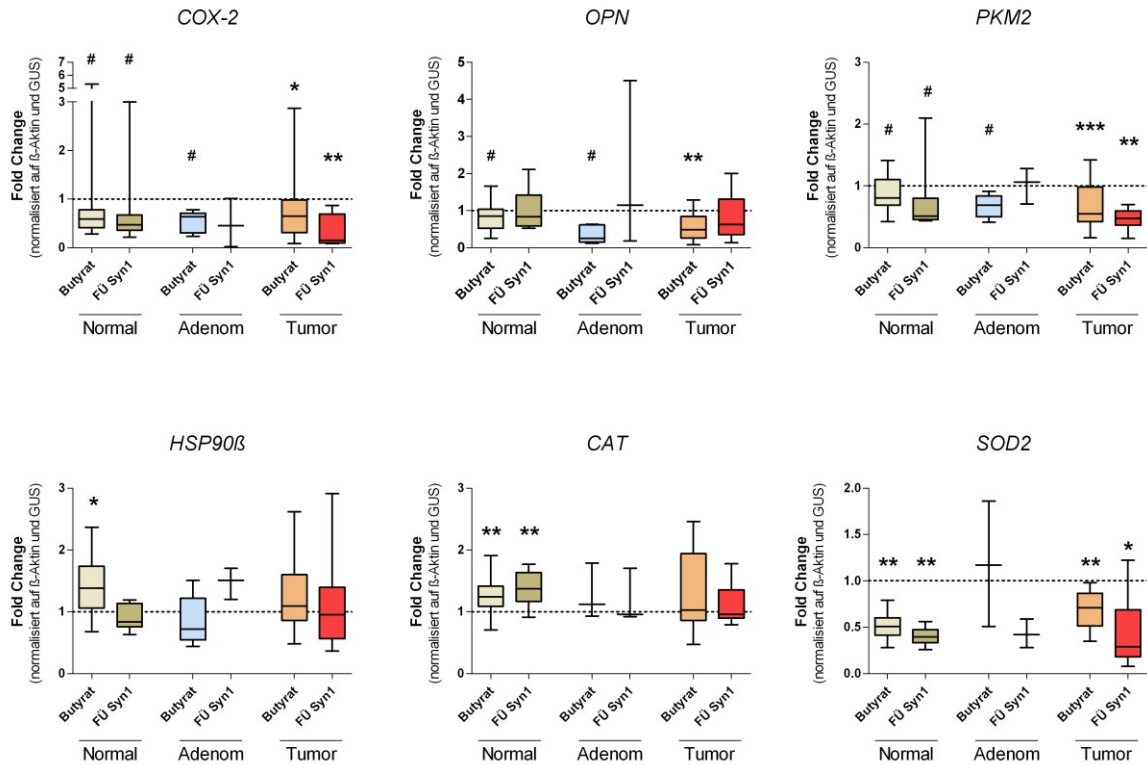


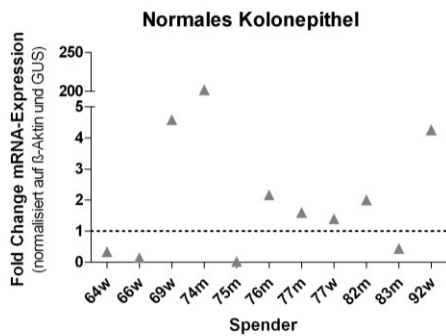
Abb. 8: Einfluss von FÜ Synergy1® (10 %) auf die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene in gepaartem Normal-, Adenom und/oder Tumorgewebe des Kolons im Vergleich zu Butyrat (10 mM). Die mRNA-Expression der Gewebe wurde nach Applikation der Testsubstanzen (12 h) mittels qPCR ermittelt und als Veränderung relativ zur jeweiligen Kontrolle (Medium oder FÜ Blank; gestrichelte Linie) dargestellt. Die Daten zum Einfluss von Butyrat sind als Teil eines Manuskripts (Publikation IV) bereits für eine Veröffentlichung vorbereitet und wurden aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit und Anschaulichkeit in der Abb. ergänzt (FÜ Syn1, Fermentationsüberstand von Synergy1®; COX-2, Cyclooxygenase-2; OPN, Osteopontin; PKM2, Pyruvatkinase M2; HSP90β, Hitzeschockprotein 90β; CAT, Katalase; SOD2, Superoxiddismutase 2; GUS, β-Glucuronidase; Wilcoxon matched pairs test: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; #p<0,1 (Tendenz); n=9-20 Spender).

3.6 Einfluss von Butyrat auf die alpha-Defensin mRNA-Expression im Normal- und Tumorgewebe des humanen Kolons

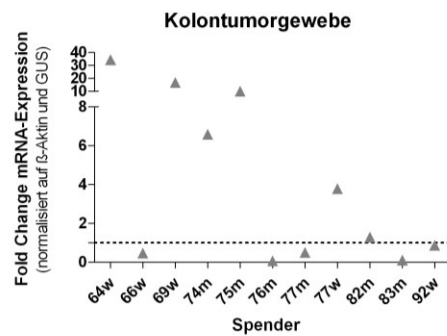
Antimikrobielle Peptide spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr und schützen die intestinale Mukosa vor Invasion und Adhärenz von pathogenen sowie kommensalen Bakterien ⁽²¹⁸⁾. Die protektiven Eigenschaften von Butyrat hinsichtlich der Regulation zellulärer Schutzmechanismen lassen dabei vermuten, dass möglicherweise auch ein Einfluss auf die alpha-Defensine HNP1-3 und HD6 besteht. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es deshalb, mögliche Veränderungen im mRNA-Expressionsmuster dieser Defensine mittels qPCR in humanem Kolongewebe (Normal und Tumor) nach Butyrat-Applikation (10 mM, 12 h) zu erfassen. Die kurzkettige Fettsäure führte dabei mehrheitlich (7/11) zu einem Anstieg der *DEFA6*-Transkriptmenge im normalen Kolonepithel (medianer Fold Change: 1,6; p=0,17), während im Tumorgewebe kein

generelles Expressionsmuster erkennbar war ($p=0,24$) (Abb. 9). Im Unterschied zu *DEFA6* konnten *DEFA1-3* bedingt durch ihre prinzipielle Lokalisation in den neutrophilen Granulozyten nur bei wenigen Spendern ($n=5$) detektiert werden (Abb. 9), so dass kein tendenzieller Einfluss von Butyrat auf *DEFA1-3* feststellbar war. Im malignen Gewebe hingegen wurde eine Zunahme der *DEFA1-3* Transkriptmenge verzeichnet (medianer Fold Change: 1,31), die jedoch vorerst ohne signifikante Bedeutung bleibt ($p=0,55$) (Abb. 9).

DEFA6

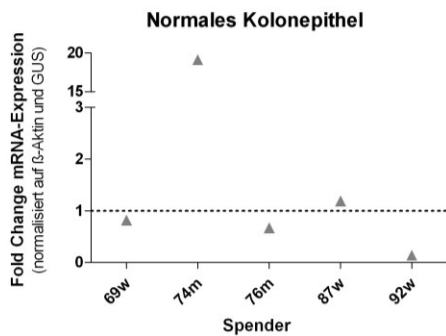


▲ 10 mM Butyrat vs. Medium

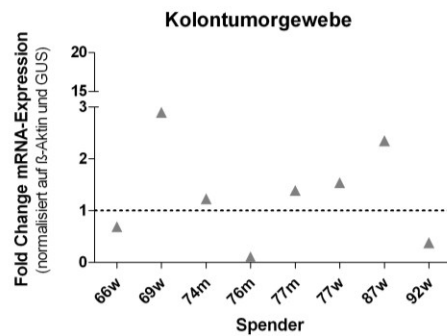


▲ 10 mM Butyrat vs. Medium

DEFA1-3



▲ 10 mM Butyrat vs. Medium



▲ 10 mM Butyrat vs. Medium

Abb. 9: Einfluss von Butyrat auf die Genexpression von alpha-Defensinen im Normal- und Tumorgewebe des Kolons individueller Spender. Veränderungen der Transkriptmenge wurden nach Butyratbehandlung (10 mM, 12 h) der gepaarten Gewebe mittels qPCR erfasst und als Vielfaches (Fold Change) im Vergleich zur Kontrolle (Medium, gestrichelte Linie) dargestellt. Jeder Spender ist durch sein Alter und Geschlecht (w, weiblich; m, männlich) charakterisiert (GUS, β -Glucuronidase; Wilcoxon matched pairs test, $n=5-11$ Spender).

3.7 Modulation der Aktivität von SOD1 durch Butyrat im humanen Kolon

In Ergänzung zu den Untersuchungen der SOD2-Expression und -Aktivität in kolorektalen Tumoren (**Publikation IV**) wurde die Aktivität der SOD1 sowie die Gesamt-Aktivität der Superoxiddismutasen im Kolonadenom- und Kolontumorgewebe ermittelt. Die Messung erfolgte spektralphotometrisch bei 450 nm unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Superoxiddismutase Assay Kits (Artikelnummer 706002, Cayman Chemical). Durch Differenzbildung zwischen der Gesamt-SOD- (ohne NaCN) und SOD2-Aktivität (mit NaCN) wurde folglich die Aktivität Cu/Zn- und Fe-haltiger SOD-Isoformen ermittelt. Da FeSOD ausschließlich in Bakterien, Protisten und Pflanzen nachgewiesen wurde⁽²¹⁹⁾, ist die restliche Aktivität in den Ansätzen der SOD1 zuzuschreiben.

Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Veränderungen (Fold Change) der SOD-Aktivität in den verschiedenen transformierten Kolongeweben. Während die verfügbaren Adenomproben keinen signifikanten Unterschied zum Normalgewebe aufwiesen (Abb. 10A), zeigten Kolontumore eine 1,5-fach und signifikant erhöhte SOD2-Aktivität (Abb. 10B). Eine leichte, jedoch insignifikante, Aktivitätsabnahme konnte dagegen für die SOD1 verzeichnet werden. Interessanterweise korrelierten hierbei die individuellen Veränderungen des zytosolischen Enzyms positiv mit denen der Gesamt-SOD in beiden Geweben (Adenom: $r=0,79$, $p=0,048$; Tumor: $r=0,60$, $p=0,02$).

Stärker im Fokus als die basale Aktivität stand jedoch die Induzierbarkeit des antioxidativen Enzymsystems in gesunden Zellen. Neben der signifikanten Steigerung der Aktivität von SOD2 (**Publikation IV**), bewirkte Butyrat (10 mM) einen Anstieg der im Zytosol lokalisierten SOD1 (median 1,25-fach, 9/14), der sich gleichermaßen in einer erhöhten Gesamt-SOD Aktivität (median 1,32-fach) widerspiegelte (Abb. 11A). Mit Ausnahme der SOD1 erreichten alle Veränderungen ein signifikantes Niveau. Korrelationsanalysen zeigten darüber hinaus, dass Veränderungen der SOD1-Aktivität gut durch die der Gesamt-SOD reflektiert werden ($r=0,93$, $p<0,0001$). Weitere Zusammenhänge zwischen individueller SOD2 und Gesamt-SOD oder SOD1 und SOD2 wurden hingegen nicht gefunden.

Eine ähnliche Aktivitätssteigerung konnte ebenso im Adenomgewebe beobachtet werden. Hier führte Butyrat im Mittel zu einer Induktion beider SODs (SOD2: median 1,52-fach, $p<0,05$; SOD1: median 1,45-fach, $p=0,16$), die sich wiederum in einer erhöhten Gesamtaktivität (median 1,49-fach, $p<0,05$) widerspiegelte (Abb. 11B). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Aktivitäten von SOD1 und Gesamt-SOD wurde auch im Kolonadenomgewebe bestätigt ($r=0,89$, $p<0,05$).

Tumore zeigten hingegen eine größere Variabilität gegenüber Butyrat und ließen bisher kein generelles Aktivitätsmuster erkennen (Abb. 11C). Bei dieser Gewebeart wurde im

Unterschied zu den nicht-malignen Geweben eine signifikante Korrelation zwischen SOD2 und Gesamt-SOD festgestellt ($r=0,77$, $p<0,01$).

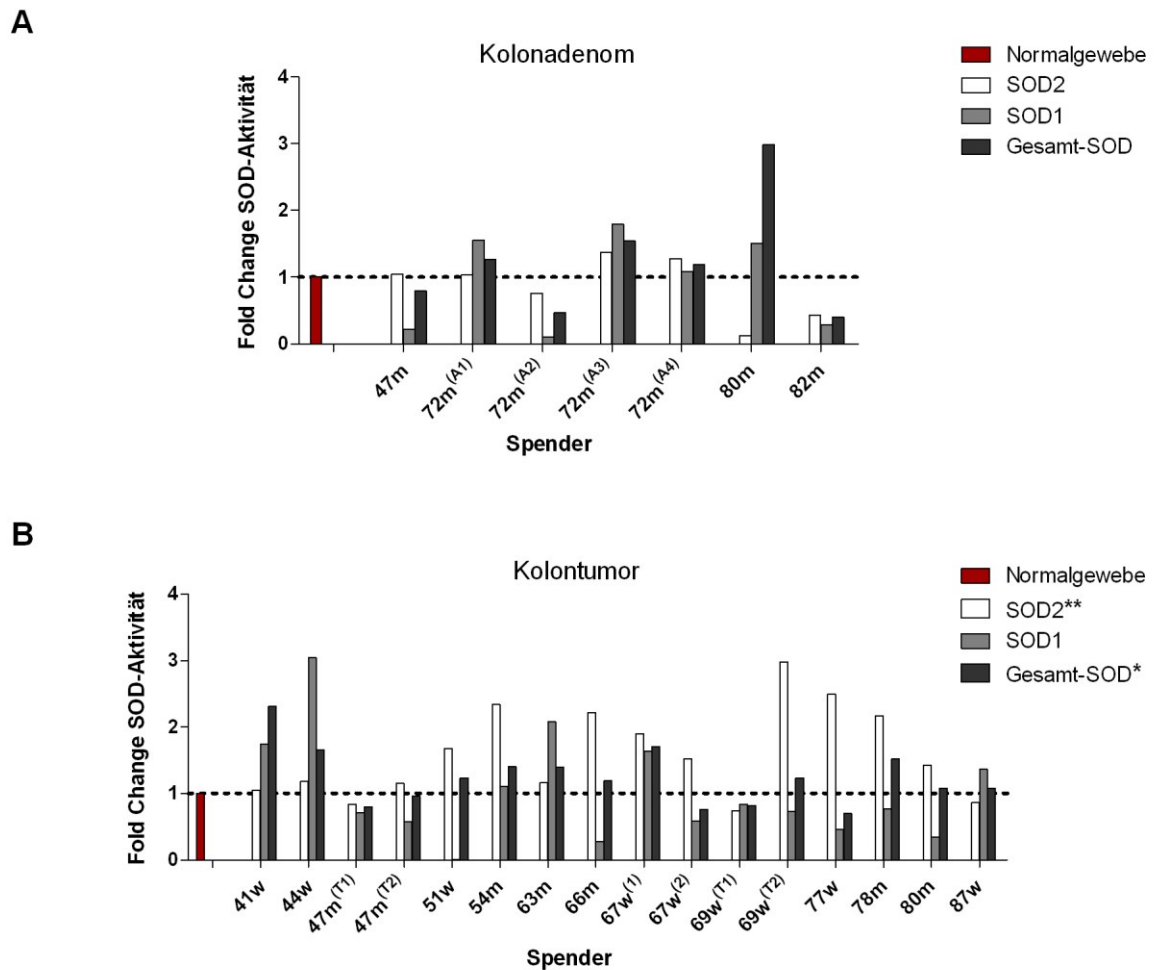


Abb. 10: Basale SOD-Aktivität in (A) Kolonadenomen und (B) -karzinomen im Vergleich zum normalen Kolonepithel. Die Messung der Aktivität erfolgte spektralphotometrisch (450 nm) mit und ohne Zusatz von NaCN (3 mM, spezifischer SOD1-Inhibitor) nach Extraktion der zytosolhaltigen Gewebeextrakte. Die enzymatische Aktivität wurde auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert und als Vielfaches (Fold Change) der Aktivität des normalen Kolonepithels (=1, gestrichelte Linie) dargestellt. Die Daten zur Aktivität der SOD2 sind dabei bereits als Teil eines Manuskriptes (Publikation IV) für eine Veröffentlichung vorbereitet; sie wurden jedoch aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit und Anschaulichkeit in die Abb. aufgenommen. Jeder Spender ist durch sein Alter und Geschlecht (x-Achse) charakterisiert (w, weiblich; m, männlich; A1 bzw. T1, Adenom 1 bzw. Tumor 1; A2 bzw. T2, Adenom 2 bzw. Tumor 2 usw.; ⁽ⁿ⁾ Nummerierung von Spendern gleichen Alters und Geschlechts; SOD, Superoxiddismutase; Wilcoxon matched pairs test: * $p<0,05$, ** $p<0,01$; $n=7-16$).

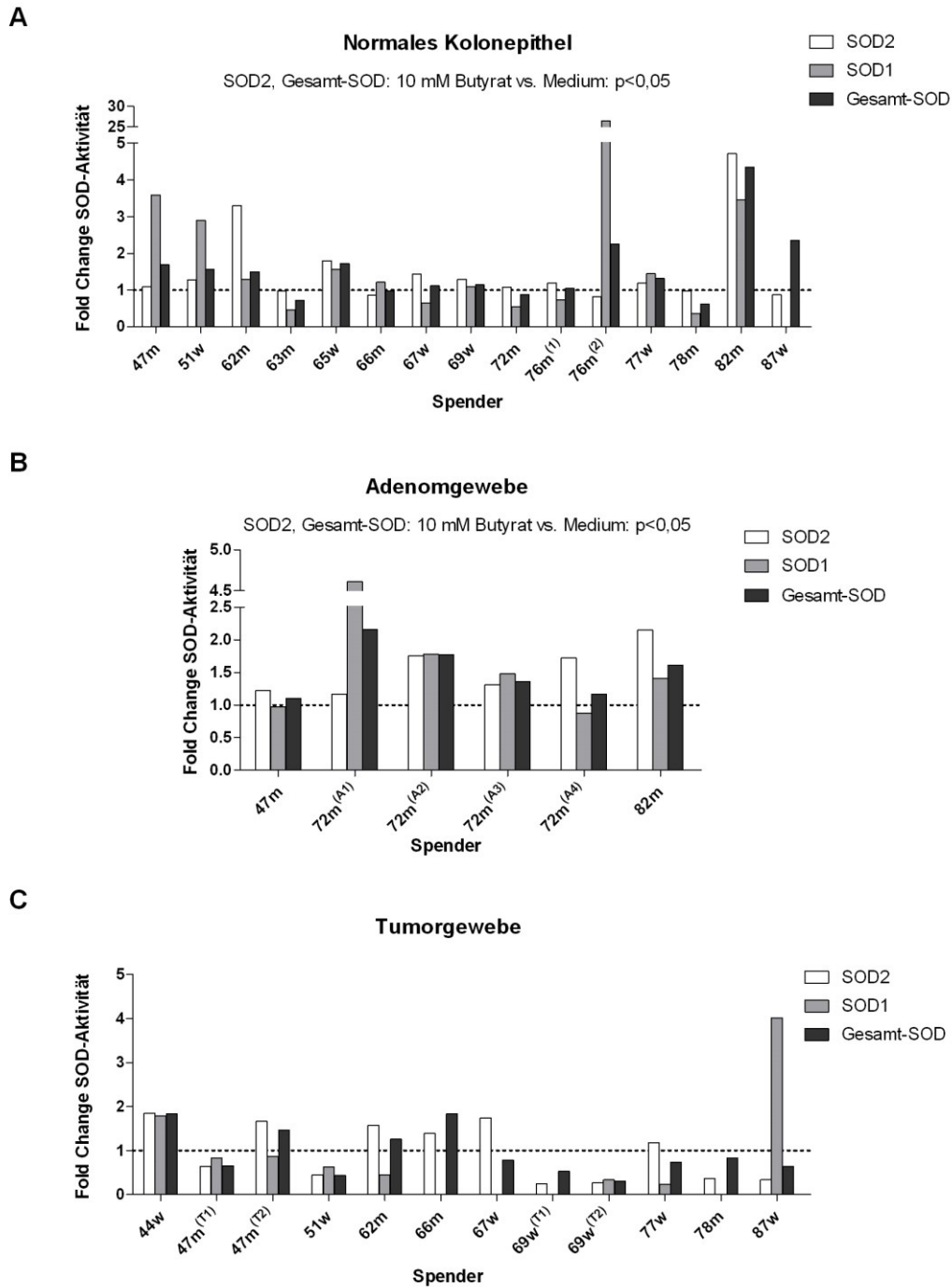


Abb. 11: Modulation der SOD-Aktivität durch Butyrat im malignen und nicht-malignen Kolongewebe. Die Messung der SOD-Aktivität erfolgte mit und ohne Zusatz von NaCN (3 mM, spezifischer SOD1-Inhibitor) spektralphotometrisch bei 450 nm nach der Behandlung (12 h) der (A) Normal-, (B) Adenom- und (C) Kolongewebeproben mit 10 mM Butyrat. Die Werte wurden auf den dazugehörigen Proteingehalt der Proben normalisiert und als Vielfaches (Fold Change) im Vergleich zur Mediumkontrolle (=1, gestrichelte Linie) dargestellt. Jeder Spender ist durch sein Alter und Geschlecht (w, weiblich; m, männlich) gekennzeichnet. Die Daten zur Aktivität der SOD2 sind dabei bereits Teil eines zur Veröffentlichung vorbereiteten Manuskripts (Publikation IV) und wurden aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit und Anschaulichkeit in die Abb. aufgenommen (A1 bzw. T1, Adenom 1 bzw. Tumor 1; A2 bzw. T2, Adenom 2 bzw. Tumor 2 usw.; ⁽ⁿ⁾ Nummerierung von Spendern gleichen Alters und Geschlechts; SOD, Superoxiddismutase; Wilcoxon matched pairs test: * $p < 0,05$; $n = 6-15$ Spender).

4 Diskussion

Von 2008 bis Anfang 2012 wurden von insgesamt 69 Dickdarmkrebs- und Polypose-Patienten Gewebeproben des Kolons bearbeitet, die den Ausgangspunkt für die Untersuchungen dieser Arbeit bildeten. Die Mehrzahl der Normal-, Adenom- und/oder Tumorgewebeproben stammt dabei aus den Jahren 2008 und 2009. Proben von 60 Patienten lieferten ausreichend Gewebe, welches neben der Analyse der Basalexpression einer Behandlung mit Butyrat und *in vitro* fermentiertem Synergy1® unterzogen wurde. Zu stark degradierte Proben-RNA, eine abweichende Diagnose oder die nachträgliche Information über eine durchgeführte Bestrahlungsbehandlung haben jedoch dazu geführt, dass nur Gewebematerial von insgesamt 51 Patienten für die verschiedenen Untersuchungen verwendbar war.

Die Nutzung von humanem Primärgewebe in Kultur bietet im Unterschied zu den häufig verwendeten Tumorzelllinien die einzigartige Möglichkeit, direkte Effekte von Butyrat oder anderen Fermentationsprodukten auf die eigentlichen Zielzellen der Kolonkarzinogenese und damit assoziierte Mechanismen der Chemoprävention *ex vivo* zu untersuchen. An die Durchführung derartiger Analysen werden allerdings besondere Anforderungen gestellt, wie z. B. eine sehr gute Kooperation mit einer lokalen Klinik sowie eine äußerst flexible Gestaltung des experimentellen Alltags. Diese wird durch die Abhängigkeit der Bereitstellung des Probenmaterials vom Operationsplan der Klinik notwendig.

4.1 Basale Expression ausgewählter Gene in humanen Kolontumoren

Die Entwicklung maligner Kolontumore erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, der mit Veränderungen in der DNA und der Fehlregulation von Genen einhergeht. Neben genetischen Anomalitäten wurde mittels gen- und proteinexpressionsanalytischer Verfahren eine Vielzahl an Genen bzw. Proteinen identifiziert, die unterschiedliche Expressionsmuster im normalen und malignen Kolongewebe aufweisen. Bianchini und Kollegen⁽²²⁰⁾ identifizierten in diesem Zusammenhang 1306 bekannte Gene mit einer veränderten Expression, die häufig in die Zellteilung oder Apoptose-Inhibition involviert sind. Die Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten Transkripte wurde überexprimiert in Kolontumoren gefunden (**Publikation I, II, III, IV, weitere Ergebnisse**). Dabei kann ferner zwischen Genen mit hoher bzw. starker Überexpression (*OPN*, *COX-2*) und Genen mit einem leichten bzw. moderaten Expressionsanstieg (*PKM2*, *HSP90 β* , *SOD2*, *GSTP1*, *DEFA1-3*, *DEFA6*) unterschieden werden. Gene wie *CAT* und *GSTM2* zeigten dagegen eine verminderte mRNA-Expression, die ebenso wie die der oben genannten Gene von Bedeutung für das Tumorwachstum ist. Derartige Veränderungen im Expressionsmuster sind für diese Gene bereits bekannt und konnten durch die Ergebnisse der vorliegenden

Analyse, welche im Vergleich zu vielen anderen Studien ein kleineres Probandenkollektiv genutzt hat, bestätigt und darüber hinaus ergänzt werden. Während COX-2^(75,76), OPN⁽⁵³⁾, PKM2^(97,221), HSP90 β ^(109,222), DEFA1-3^(119,223,224), DEFA6⁽¹²⁸⁾ und SOD2^(225,226) in Kolontumoren einheitlich als überexprimiert beschrieben werden, gibt es beispielsweise für CAT divergierende Ergebnisse^(149-151,227). Diese zeigen jedoch mehrheitlich eine verminderte Aktivität in Kolontumoren und befinden sich somit im Einklang mit den Daten zur Genexpression des antioxidativen Enzyms. Erhöhte Transkriptmengen von *PKM2*, *HSP90 β* und *DEFA6* wurden darüber hinaus in dieser Arbeit in Kolonadenomen festgestellt und deuten auf eine frühe Beteiligung der korrespondierenden Proteine an der Kolonkarzinogenese oder einen negativen Feedback-Mechanismus hin.

Von größerer Bedeutung als die vorliegende Transkriptmenge ist jedoch die Expression der korrespondierenden Proteine, die die eigentlichen Akteure im zellulären Metabolismus sind. Hierbei zeigte sich, dass die mRNA-Expression einzelner Gene ein eher unverlässlicher Parameter ist, um Veränderungen auf Proteinebene vorherzusagen (**Publikation II, III, IV, weitere Ergebnisse**). Dennoch konnte für *SOD2* und *PKM2* neben den erhöhten Transkriptleveln ein simultaner Anstieg der jeweiligen Proteinexpression in Adenomen und Tumoren nachgewiesen werden, der sich im Tumorgewebe als signifikant erwies. Proteine wie CAT, GSTP1 und HSP90 β , die anhand der vorliegenden Daten ebenso für einen Vergleich beider Parameter herangezogen werden konnten, zeigten im Unterschied zur mRNA-Ebene keine signifikanten Veränderungen ihrer jeweiligen Expression zwischen malignem und normalem Gewebe. Möglicherweise durch die Verwendung größerer Probandenkollektive ließ sich in anderen Untersuchungen jedoch eine Repression (CAT) oder Überexpression (GSTP1) dieser Proteine feststellen, die mit den Ergebnissen zur mRNA-Expression in dieser Arbeit übereinstimmen^(170,228,229). Obwohl für HSP90 β ebenso eine Überexpression in Kolontumoren beschrieben wurde⁽¹⁰⁹⁾, gelang es in einer vorhergehenden Studie von Radeva⁽²²²⁾ und in dieser Arbeit nicht, diese auf Proteinebene zu bestätigen. Die scheinbar widersprüchlichen Veränderungen auf beiden Expressionsebenen lassen den Einfluss posttranskriptioneller Regulationsmechanismen vermuten und wurden bereits von anderen Autoren für viele spezifische Gene in malignen und normalen Zellen dokumentiert^(230,231). Weitere Ausführungen hierzu sind im Kapitel 4.3 zu finden.

4.1.1 *DEFA6*-Expression im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Tumore

Defensine sind allgemein als antimikrobielle Peptide bekannt, die jedoch auch durch ihre erhöhte Expression bei verschiedenen Tumorerkrankungen zu Aufmerksamkeit gelangten. Im Unterschied zu Tumoren existieren bislang allerdings nur wenige Studien, die Auskunft über eine mögliche Expression von Defensinen in prämaligen Stadien der

Kolonkanzerogenese (z. B. Polypen, Adenome) geben ⁽²²⁴⁾. Die vorliegende Studie konnte neben einer signifikant erhöhten *DEFA6*-Transkriptmenge im Kolontumorgewebe zum ersten Mal einen massiven Anstieg (100-fach) des enterischen Defensins in Kolonadenomen zeigen und *DEFA6* damit als einen potenziellen Marker identifizieren, der zur Diagnose prämaligener Tumorstadien herangezogen werden könnte (**Publikation I**).

Vorhergehende Studien hatten *DEFA6* aufgrund der erhöhten mRNA-Mengen in Kolontumoren bereits als einen potenziellen Marker für maligne Tumore des Kolons beschrieben. Nam *et al.* ⁽¹²⁸⁾ hatten hierbei gezeigt, dass Kolontumore im Vergleich zu anderen Tumorarten *DEFA6* etwa 5-mal so häufig exprimieren. Damit besitzt *DEFA6* zum einen das Potenzial, spezifisch die Anwesenheit maligner Veränderungen der Kolonmukosa anzuzeigen und zum anderen mit weitaus größerer Empfindlichkeit auf das Vorhandensein prämaligener Läsionen hinzuweisen. Um sich als Tumormarker oder Marker für prämaligene Tumorstadien zu etablieren, sollte das Protein allerdings in ausreichender Menge von den Zellen sekretiert werden, so dass es idealerweise im Serum von betroffenen Patienten nachgewiesen werden kann. Für Kolonkrebspatienten konnte dieser Nachweis bereits erbracht werden ⁽¹²⁸⁾, dennoch fehlen bislang groß angelegte klinische Studien. Bei Adenompatienten ist die Untersuchung des Blutes hingegen schwieriger, da Veränderungen des Kolonepithels in diesem Stadium meist komplikations- und beschwerdefrei sind und dementsprechend erst diagnostiziert werden, wenn die maligne Transformation bereits stattgefunden hat. Folglich existieren bislang keine Daten zum HD6 (Protein)-Gehalt im Serum von Patienten mit einem diagnostizierten Adenom.

Welche Rolle der Anstieg von *DEFA* bzw. HD6 in der Entwicklung kolorektaler Karzinome spielt, ist bisher unbekannt. Eine Studie von Pagnini *et al.* ⁽²³²⁾ hat allerdings gezeigt, dass Kolonadenome neben einer Überexpression enterischer Defensine eine reduzierte Anzahl an adhärennten Bakterien aufweisen. Die Expression der Defensine könnte hierbei sowohl als Ursache als auch als Folge mit möglicherweise schützender Funktion gegen invasive Bakterien betrachtet werden.

DEFA6 ist darüber hinaus als Zielgen des Wnt-Signalweges beschrieben worden ⁽³¹⁾. Dieser ist essentiell für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und führt bei konstitutiver Aktivierung zur Initiation der Tumorgenese ⁽¹³¹⁾. Mehr als 80 % aller kolorektalen Adenome weisen dabei Mutationen im *APC*-Gen auf, die mehrheitlich zu einem verkürzten Protein führen. Seltener wurden hingegen Mutationen in anderen Signalmolekülen, wie beispielsweise β -Catenin und/oder Axin2, festgestellt, die ebenso ursächlich für eine Hyperaktivierung des Wnt-Signalweges sein können ⁽²³³⁾. Die hohe Expression von *DEFA6* könnte demnach die Folge eines aktivierten Wnt-Signalweges sein, wobei sich der Einfluss anderer Signalwege derzeit nicht ausschließen lässt. Vor

allem im Hinblick auf die deutlich niedrigere Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum prämaligen Stadium ist eine Regulation durch weitere Proteine, welche als Teil anderer Signalkaskaden agieren, sehr wahrscheinlich. Zur Beantwortung dieser Fragen sind letztendlich weiterführende Untersuchungen notwendig.

4.1.2 Korrelation der mRNA-Expression mit dem Stadium und dem Differenzierungsgrad (Grading) der Tumore

Während ein kleineres Probandenkollektiv u. a. den Vorteil einer individuellen Charakterisierung und Darstellung von Expressionsmustern hat, die ein Ansatzpunkt für besser zugeschnittene Therapieprogramme sein könnten, erfordert die Identifikation von Zusammenhängen mit klinischen Charakteristika vielmehr eine hohe Anzahl an Studienteilnehmern. Bedingt durch die limitierte Anzahl an Gewebespendern konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der mRNA-Expression und dem Stadium sowie dem Differenzierungsgrad der Tumore nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellte hierbei jedoch die *PKM2* dar, deren Transkriptlevel mit fortgeschrittener Dedifferenzierung der Kolontumore erhöht war ($r=0,43$, $p=0,07$; **Publikation III**). In Ergänzung dessen beobachteten Tonus und Kollegen eine positive Korrelation zwischen der PKM2-Proteinkonzentration und dem Stadium kolorektaler Tumore im Stuhl von Krebspatienten⁽²³⁴⁾. Darüber hinaus zeigten sich in anderen Studien ebenso Abhängigkeiten zwischen der Expression von SOD2, OPN, COX-2, CAT sowie HSP90 β und dem Tumorstadium oder Differenzierungsgrad^(53,76,109,226,235). Für *GSTP1*, *GSTM2*, *DEFA1-3* und *DEFA6* wurde dagegen kein Zusammenhang identifiziert⁽²²⁴⁾.

Neben der Größe des Probandenkollektivs spielt die Verteilung der Tumorstadien bzw. des Gradings eine weitere wichtige Rolle. Untersuchungen von Cable *et al.*⁽²³⁵⁾ zur Aktivität peroxisomaler Enzyme (darunter CAT) konnten aufgrund der relativ geringen Anzahl an Tumoren in bestimmten Tumorstadien nur signifikante Unterschiede zwischen den Stadien Duke B und C ermitteln. Studien von Agrawal *et al.*⁽⁵³⁾ und Soumaoro *et al.*⁽⁷⁶⁾, die einen signifikanten Anstieg der Gen- und/oder Proteinexpression von OPN bzw. COX-2 während der Tumorprogression beschrieben haben, konnten hingegen 80-100 Gewebespendern mit mindestens 20 Patienten je Tumorstadium berücksichtigen.

4.1.3 Korrelation der mRNA-Expression ausgewählter Gene oder der Enzym-aktivität mit dem Alter der Patienten

Neben den unterschiedlichen Expressionsleveln im normalen und malignen Kolongewebe wurden mitunter ebenso beachtliche Variationen in der Expression einzelner Gene bzw. der katalytischen Aktivität der korrespondierenden Proteine zwischen den Spendern festgestellt. Enzyme der antioxidativen Abwehr erwiesen sich hierbei als altersabhängig

und zeigten eine Abnahme ihrer enzymatischen Aktivität im normalen Kolonepithel mit zunehmendem Alter der Spender (**Publikation IV**). Dass das Alter neben genetischen und epidemiologischen Faktoren einen Einfluss auf die Aktivität von CAT und SOD2 hat, wurde bereits in vorhergehenden Studien entdeckt, die jedoch generell widersprüchliche Ergebnisse zeigten ⁽²³⁶⁻²⁴¹⁾. Diese Differenzen könnten beispielsweise in der Verwendung von unterschiedlichen Gewebe- bzw. Zelltypen zur Messung der Aktivitäten begründet liegen. Ferner scheint die Anzahl der verschiedenen Altersklassen, denen die Probanden zugeordnet werden, von Bedeutung zu sein. Während Janssen *et al.* ⁽²²⁵⁾ bei einer Aufteilung der Patienten in „jünger als 66,1 Jahre“ und „älter als 66,1 Jahre“ keinen altersbedingten Unterschied zwischen der SOD2-Aktivität im normalen Kolonepithel festgestellt hatten, konnte in dieser Arbeit unter Anwendung einer Korrelationsanalyse nach Spearman erstmalig eine Abnahme des Mn-abhängigen Isoenzym mit zunehmendem Alter der Spender gezeigt werden.

Bei älteren Patienten wurden im Vergleich zu den jüngeren Teilnehmern der Studie zudem geringere Transkriptmengen des glykolytischen Enzyms PKM2 gefunden (**Publikation III**). Auf Proteinebene des Enzyms konnte dieser Zusammenhang bislang jedoch nicht bewiesen werden, was u. a. durch die niedrigere Anzahl an Gewebeproben, die diesbezüglich zur Verfügung stand, bedingt sein könnte. In der Literatur scheint diese Beobachtung bisher einzigartig zu sein, da weder ähnliche noch gegenteilige Ergebnisse berichtet wurden. Der Alterungsprozess von Geweben ist mit zellulären und molekularen Veränderungen assoziiert, die beispielsweise auch die Expression von Enzymen des glykolytischen Stoffwechselweges betreffen ⁽²⁴²⁻²⁴⁴⁾. Ungeachtet dessen konnte im Kolongewebe von jungen und alten Fischer 344 Ratten jedoch kein Unterschied im Umsatz von Glukose durch die Glykolyse festgestellt werden ⁽²⁴⁵⁾. Die verminderte mRNA-Expression der *PKM2* im alternden Kolonepithel steht damit zu diesem und auch vielen anderen Ergebnissen vorheriger Studien hinsichtlich der Alterung von Zellen bzw. Geweben ⁽²⁴⁶⁾ scheinbar im Widerspruch. Welche Bedeutung der reduzierten *PKM2*-Transkriptmenge daher beigemessen werden kann, ist bislang unklar und kann nur durch weiterführende Analysen, die allen voran die Proteinmenge bzw. Aktivität des glykolytischen Enzyms betreffen, evaluiert werden.

Für die restlichen Gene wurde entgegen vielen Studien kein Zusammenhang zwischen der Expression und dem Alter der Patienten festgestellt. Andere Autoren hatten ausgehend von den Proteinmengen und einer größeren Probenanzahl einen alterbedingten Anstieg von COX-2 ⁽²⁴⁷⁾, OPN ⁽²⁴⁸⁾, HSP90 β ⁽²⁴⁹⁾, GSTs ⁽²⁵⁰⁾ und HNP1-3 ⁽²⁵¹⁾ in gesundem humanen Gewebe nachgewiesen.

4.1.4 Korrelation der mRNA-Expression ausgewählter Gene mit dem Geschlecht der Patienten

Die vorliegenden Untersuchungen haben einen tendenziellen Unterschied der COX-2 mRNA-Expression im normalen Kolonepithel zwischen den männlichen und weiblichen Probanden der Studie aufgedeckt (**Publikation II**). Männer wiesen im Median etwa 2,5-fach höhere Transkriptlevel des proinflammatorischen Enzyms im Vergleich zu den Frauen auf ($p=0,12$). Während vorangegangene Untersuchungen von Radeva unter Verwendung eines größeren Probandenkollektivs ($n=36$) diesbezüglich sogar einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern nachweisen konnten ⁽²²²⁾, haben andere Autoren auf Proteinebene keinen Zusammenhang gezeigt ⁽⁷⁶⁾. Für die übrigen Gene wurde in dieser Arbeit kein geschlechtsspezifisches Expressionsmuster deutlich, obwohl beispielsweise für die GST-Gesamtaktivität oder das GSTP1-Protein ebenso signifikante Unterschiede beschrieben worden sind ⁽²⁵⁰⁾.

Die geringeren COX-2 Transkriptmengen bei Frauen im Vergleich zu denen von Männern könnten u. a. zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden hinsichtlich der Inzidenz kolorektaler Tumore beitragen. Frauen sind demnach weniger häufig von der Erkrankung betroffen als Männer ^(7,8). Eine wichtige Rolle scheinen hierbei Östrogene zu spielen, die nachweislich mit einem verbesserten Schutz vor Tumoren, darunter gastrointestinale Tumore, assoziiert werden ⁽²⁵²⁾. Einer Studie von Lai *et al.* ⁽²⁵³⁾ zufolge haben die weiblichen Geschlechtshormone u. a. einen regulatorischen Einfluss auf die COX-2 Expression und die damit in Verbindung stehende Zellmotilität. Die Untersuchungen belegen eine Hemmung des PGE₂-induzierten proinflammatorischen Enzyms nach Applikation von 17 β -Östradiol in LoVo-Kolonkrebszellen.

4.2 Einfluss von Darmfermentationsprodukten auf die Expression ausgewählter Gene in humanem Kolongewebe *ex vivo*

4.2.1 Modulation von *OPN*, *COX-2* und *PKM2* im Tumorgewebe

Das Modell der Kolonkarzinogenese bietet aufgrund seiner Mehrstufigkeit verschiedene Ansätze in den Prozess der Tumorentwicklung zu intervenieren und damit das Risiko für eine maligne Erkrankung zu minimieren. *OPN*, *COX-2* und *PKM2* repräsentieren dabei drei wichtige Schlüssel-moleküle mit ganz unterschiedlicher Bedeutung für die einzelnen Stadien der Tumorgenese. Während *COX-2* und *OPN* bereits als Angriffsziele von Butyrat, meist unter Verwendung von In-vitro-Zellmodellen, identifiziert worden sind ^(254,255), existieren für *PKM2* nach gegenwärtiger Recherche hingegen keine Daten zur Butyrat-Sensitivität. Die vorliegende Studie gewährt daher tiefgründigere Einblicke in die Reaktion des humanen Kolongewebes auf intestinale Abbauprodukte von Ballaststoffen und zeigte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von *OPN*,

COX-2 und *PKM2* im Tumorgewebe des Kolons nach Butyrat-Applikation *ex vivo* (**Publikation II, III**). Ähnliche Effekte bezüglich der Regulation von COX-2 und *PKM2* konnten auch durch FÜ Syn1[®] beobachtet werden, der durch seine Komplexität die physiologische Situation noch besser reflektiert (**Weitere Ergebnisse**).

Bei *OPN* erfolgte die Reduktion des mRNA-Anstiegs im malignen Kolongewebe in Abhängigkeit der basalen Transkriptmenge des Proteins über einen bislang nicht bekannten Mechanismus. Eine Hemmung der mRNA-Expression konnte zudem in den nicht-malignen Kolongeweben festgestellt werden, die mit ähnlicher Sensitivität auf die SCFA reagierten. Eine vorhergehende Studie von Tabuchi *et al.* ⁽²⁵⁴⁾ identifizierte *OPN* bereits als ein Butyrat-responsives Gen, wobei die Applikation der C₄-Fettsäure (2 mM) in epithelialen Mauskolonzellen (MCE301) einen Anstieg der Genexpression von *OPN* bewirkte. Diese Hochregulation konnte in geringerer Intensität auch auf Proteinebene beobachtet werden. Dennoch lassen die Differenzen zwischen beiden Parametern, die auch in dieser Arbeit vorliegen, auf eine zeitliche Verzögerung komplexer, biologisch miteinander verknüpfter Prozesse oder auf das Vorliegen posttranskriptioneller Regulationsmechanismen schließen. Eine entscheidende Rolle spielt in diesem Zusammenhang ebenso die Wahl der verwendeten Antikörper beim Nachweis des Proteins. *OPN* tritt aufgrund von Splice-Vorgängen und extensiven posttranslationalen Modifikationen (u. a. Phosphorylierung, Glykosylierung, Thrombin-Spaltung) zelltypspezifisch in verschiedenen Erscheinungsformen auf ^(67,256), weshalb ein adäquater Nachweis schwierig ist. Hinzu kommt, dass die Bindung der verwendeten Antikörper beispielsweise durch den Phosphorylierungsgrad oder die Fragmentierung durch Thrombin beeinflusst werden kann ⁽²⁵⁷⁻²⁵⁹⁾.

Obwohl der in dieser Arbeit verwendete *OPN*-Assay nicht zwischen den verschiedenen *OPN*-Splice-Varianten unterscheidet, detektiert dieser wie viele andere kommerziell erhältliche *OPN* ELISAs, die zum Zeitpunkt der Messung verfügbar waren, nur das ungespaltene Protein ⁽²⁵⁷⁾. Da die Spaltung durch Thrombin neben ihrer physiologischen Bedeutung in inflammatorischen Prozessen und der Neubildung von Gewebe zuweilen eine pathologische Funktion in Tumoren besitzt ⁽²⁵⁶⁾, kann davon ausgegangen werden, dass nicht die gesamte *OPN*-Menge in den Proben detektiert wurde. Erforderlich wäre hierzu ein ELISA-System, welches nach Möglichkeit monoklonale Antikörper verwendet, die mit gleicher Affinität beide Erscheinungsformen des Glykoproteins (ungespalten und gespalten) unabhängig vom Modifizierungsgrad erfassen können.

Neben der Wahl des ELISA-Systems hat auch die Anzahl der analysierten Proben sowie die Verwendung von humanem Gewebe einen erheblichen Einfluss auf die Korrelation zwischen dem mRNA- und Proteinexpressionsniveau von *OPN*. Die Heterogenität des Tumorgewebes könnte unterschiedliche Effekte von Butyrat in verschiedenen

Tumorarealen bewirken, was v. a. im Hinblick auf OPN von besonderer Bedeutung ist, da das Protein sowohl durch Tumor- als auch Immunzellen synthetisiert wird und scheinbar unterschiedliche Funktionen in Abhängigkeit des Zelltyps ausübt ⁽²⁶⁰⁾.

Wie Butyrat in die Regulation der OPN-Expression eingreift, ist bislang nicht bekannt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Sharma *et al.* ⁽²⁶¹⁾ zeigte jedoch am Beispiel von Trichostatin A, einem Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitor, dass dieser die experimentell induzierte OPN-Transkription, in die scheinbar HDAC1 involviert ist, hemmen kann. Butyrat, welches ebenso HDAC-hemmende Eigenschaften (u. a. gegenüber HDAC1) besitzt ⁽⁹¹⁾, könnte demnach über eine Inhibierung Histon-modifizierender Enzyme Einfluss auf die Genexpression von OPN nehmen.

Eine Herunterregulation der COX-2 Expression in Tumorzellen ist ähnlich wie bei OPN mit einer Modulation zellregulatorischer Prozesse assoziiert, die konsequenterweise zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen ⁽⁸¹⁾. Neben NSAIDs und spezifischen COX-2 Hemmern konnte ebenso für eine Reihe bioaktiver Pflanzenstoffe und Fermentationsprodukte wie Butyrat eine COX-2 senkende Wirkung demonstriert werden ^(255,262). In der vorliegenden Studie wurde dieser Effekt für Butyrat nun erstmalig an humanem Kolontumorgewebe auf mRNA-Ebene des Gens gezeigt (**Publikation II**). Die Daten bestätigen damit jedoch nur zum Teil vorherige Studienergebnisse, die meist unter Verwendung von Zellmodellen ^(255,263,264) und Primärgewebe ⁽²⁶⁵⁾ im Zusammenhang mit einer Entzündung generiert wurden. Eine Reduktion der mRNA-Expression des inflammatorischen Enzyms konnte darüber hinaus auch in den nicht-malignen Geweben beobachtet werden. Hierbei reagierte das normale Kolonepithel umso empfindlicher auf Butyrat, je höher die basale Transkriptmenge des COX-2 Gens war. Sauer *et al.* ⁽²⁶⁶⁾ hatten bereits in initialen Untersuchungen eine vergleichbare Verminderung der COX-2 mRNA im Normalgewebe gezeigt. Das Probenmaterial stammte allerdings von einer wesentlich kleineren Patientenkohorte (n=6).

Ein Vergleich der COX-2 mRNA-Expression mit dem dazugehörigen Protein bzw. der PGE₂-Konzentration nach Butyrat-Applikation ergab nur in 33 % (4 von 12) der analysierten Normal- und Tumorgewebeproben eine annähernde Übereinstimmung der Veränderungen. Die Ergebnisse stehen damit scheinbar im Widerspruch zu denen anderer Autoren, die eine simultane Reduktion aller drei Parameter nach Butyrat-Vorbehandlung (4 mM, 30 min bis zu 24 h) und anschließender Stimulation der COX-2 Expression mit dem Tumornekrosefaktor-alpha in HT29-Kolonkrebszellen beobachten konnten ⁽²⁵⁵⁾. Aufgrund der einmaligen Bestimmung aller Expressionsdaten nach 12 h, was durch die zeitlich limitierte Kultivierung des humanen Kolongewebes *ex vivo* bedingt ist ⁽²⁶⁷⁾, kann eine zeitliche Verzögerung zwischen transkriptionellen und translationalen Prozessen derzeit nicht ausgeschlossen werden. Zukünftige Untersuchungen sollten

demzufolge auch die Expression nach längeren Inkubationsperioden nicht unberücksichtigt lassen. Dies wiederum setzt eine Optimierung der Kultur primärer Kolonzellen voraus, die gegenwärtig den Schwerpunkt eines anderen Projektes darstellt. Obwohl die Transkriptmenge des COX-2 Proteins sowohl im normalen als auch im malignen Gewebe vermindert vorgefunden wurde, ist die mRNA-Menge nicht in jedem Fall ausschlaggebend für die im Anschluss translatierte Menge des dazugehörigen Proteins ^(268,269). Neben der Transkription wird der Anteil eines Proteins wesentlich durch posttranskriptionelle Modifikationen und Prozesse bestimmt, die u. a. den mRNA-Transport aus dem Zellkern, die mRNA-Stabilität oder die mRNA-Translation umfassen. Untersuchungen von Tong *et al.* ⁽²⁷⁰⁾ zufolge, ist Butyrat zwar in der Lage, die Elongation der Transkription, welche durch die RNA-Polymerase II ausgeführt wird, zu inhibieren, jedoch nicht deren Initiation. Ebenso wenig konnte die kurzkettige Fettsäure die mRNA-Stabilität, die über regulatorische Elemente in der 3'-untranslatierten Region der mRNA-Sequenz beeinflusst wird, regulieren. Die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation, die über verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege erfolgt, stellt jedoch einen entscheidenden Kontrollpunkt bei der Synthese des COX-2 Proteins dar ⁽⁸⁴⁾. Fehlregulationen dieser Mechanismen führen in der Konsequenz zu einer konstitutiven Überexpression, wie sie insbesondere in Kolontumoren beobachtet wurde ⁽⁸⁴⁾.

Die Transkription des COX-2 Gens kann ferner durch die Modulation von regulatorischen Komponenten der COX-2 aktivierenden Signalwege beeinflusst werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass Butyrat beispielsweise die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowohl in Kolonkrebszellen als auch während chronisch entzündlicher Prozesse, die einen anerkannten Risikofaktor für Dickdarmkrebs darstellen, inhibieren kann ^(195,271,272). NF- κ B ist ein zentraler Regulator inflammatorischer und immunologischer Antworten und spielt bei der Transkriptionsaktivierung des COX-2 Gens eine wichtige Rolle ^(271,273).

Auf Grundlage der bereits vorliegenden Daten und den Ergebnissen dieser Arbeit muss davon ausgegangen werden, dass COX-2 vorzugsweise in inflammatorischen Prozessen und frühen Tumorstadien, welche mit einem Kontrollverlust der transkriptionellen Aktivierung des Proteins einhergehen, durch Butyrat moduliert wird. Dem mit fortschreitender Tumorprogression assoziierten Verlust posttranskriptioneller Mechanismen, der zu einer erhöhten mRNA-Stabilität von COX-2 führt ⁽⁸⁴⁾, kann mit Butyrat folglich nicht mehr entgegengewirkt werden und begrenzt die Wirkung der kurzkettigen Fettsäure damit auf den primärpräventiven Anwendungsbereich.

Obwohl die durch COX-2 katalysierte Reaktion als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der PG-Synthese gilt, unterliegt die Bildung des Hauptmediators PGE₂ ebenso den Aktivitäten der PLA₂, der mikrosomalen Prostaglandin E Synthase (mPGES) und der 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH), die funktionell miteinander gekoppelt

sind ^(274,275). PLA2, mPGES und 15-PGDH wurden neben COX-2 dereguliert in Kolontumoren gefunden ⁽²⁷⁶⁻²⁷⁸⁾ und stellen folglich weitere potenzielle Angriffsziele in der Chemoprävention bzw. Tumorthherapie dar. In Übereinstimmung mit Pugh und Thomas ⁽⁷⁹⁾, welche erhöhte Konzentrationen an PGE₂ in Kolonadenomen und -karzinomen festgestellt hatten, konnte in der vorliegenden Arbeit eine tendenziell erhöhte Konzentration des inflammatorischen Eicosanoids im Medium der Tumore nach Kultivierung gemessen werden. Der Zusatz von Butyrat *ex vivo* hatte keine signifikanten Änderungen der PGE₂-Konzentration im Normal- und Tumorgewebe zur Folge und bestätigte damit die Beobachtungen anderer Autoren ^(279,280).

Für die fehlende Korrelation zwischen den Veränderungen der COX-2 Transkriptmenge und denen der PGE₂-Konzentration nach Butyrat-Applikation können sowohl biologische Faktoren, wie beispielsweise die Heterogenität der Tumore oder die komplexe Regulation der PGE₂-Synthese, als auch die Versuchsanordnung (zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration) ursächlich sein. Dass COX-2 und mPGES trotz funktioneller Verbundenheit keiner generalisierten Co-Regulation unterliegen, zeigten Sherratt *et al.* ⁽²⁸¹⁾ am Beispiel des phenolischen Antioxidans tert-Butylhydrochinon. In Abhängigkeit der Aktivierung antioxidativ und/oder Xenobiotika responsiver Elemente erfolgte bei dieser Substanz zwar eine Modulation der mRNA-Menge von COX-2, jedoch keine Beeinflussung der Transkriptmenge von mPGES. Eine positive Korrelation wurde hingegen für die Proteinexpression der COX-2 und PLA2 in Kolonkarzinomen festgestellt ⁽²⁷⁷⁾ und lässt auf eine parallele Regulation beider Enzyme schließen. Ferner könnte der fehlende Zusatz freier AA, das Substrat der COX-2, zum Medium eine Rolle bei den Diskrepanzen zwischen der COX-2 mRNA und dem PGE₂-Gehalt gespielt haben. Um die Verfügbarkeit freier AA zu gewährleisten, wird in vielen experimentellen Ansätzen AA exogen zugefügt. Die Omega 6-Fettsäure ist essentiell für die Bildung von PGE₂ und stimuliert darüber hinaus bei längeren Inkubationsperioden die Expression von PLA2 und COX-2, deren Regulation möglicherweise durch das neu-synthetisierte, endogen gebildete PGE₂ in einem positiven Rückkopplungsmechanismus beeinflusst wird ⁽²⁸²⁾. Für die Analyse des PGE₂-Gehaltes unter vorherigem Zusatz exogener AA wäre jedoch aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Probenmaterials frisches Kolongewebe weiterer Spender notwendig gewesen, weshalb an dieser Stelle vorerst darauf verzichtet wurde. Als eine Alternative zu AA könnte hierbei der Zusatz von Serum angesehen werden, welches PGE₂-stimulierende Eigenschaften besitzt ⁽²⁷⁴⁾ und ein Bestandteil des Primärzellmediums gewesen ist. Zukünftige Untersuchungen sollten in einem vergleichenden Ansatz dennoch abklären, unter welchen Bedingungen (mit oder ohne Substratzusatz) COX-2 funktionsfähig ist und ausreichend PGE₂ bildet, um die Wirkung von Butyrat und FÜs charakterisieren zu können. Neben der Möglichkeit einer

unzureichenden Verfügbarkeit freier AA während der Kultivierung des Gewebes, könnten die Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Expressionsebenen aber ebenso durch die marginalen Effekte von Butyrat auf die Proteinexpression der COX-2 bedingt sein, da diese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der PG-Biosynthese katalysiert.

Im Vergleich zu *OPN* und *COX-2* ist *PKM2* bislang ein wenig untersuchtes Target im Rahmen von Studien zur chemopräventiven Aktivität bioaktiver Nahrungskomponenten. Der Einfluss von Darmfermentationsprodukten (Butyrat und FÜs) wurde erstmalig in dieser Arbeit untersucht und führte im Tumorgewebe zu einer Reduktion des glykolytischen Enzyms, die jedoch nur auf mRNA-Ebene deutlich wurde (**Publikation III**). Dabei zeigte sich, dass das maligne Kolongewebe im Vergleich zu Butyrat (10 mM) ähnlich sensitiv auf das *in vitro* fermentierte Inulin/Oligofruktose-Gemisch (Synergy1®) trotz einer 3-fach geringer enthaltenen Butyrat-Menge reagierte. Vergleichbare Expressionsmuster ließen sich auch in den nicht-malignen Geweben nach Applikation der Testsubstanzen feststellen. Welche Rolle komplexe biologische Prozesse bei den Diskrepanzen zwischen Gen- und Proteinexpression spielen, ist derzeit nicht bekannt. Untersuchungen zum Abbau anderer Pyruvatkinase-Isoenzyme ^(283,284) deuten jedoch aufgrund von langen Halbwertszeiten auf eine nicht simultane Regulation beider Expressionsebenen hin. In Abhängigkeit des Gewebes und Ernährungsstatus beträgt diese beispielsweise im Dünndarm von Ratten bei Hunger etwa 9 h, während der Abbau der Pyruvatkinase vom Typ L in der Leber von Ratten in zwei Phasen ($t_{1/2}=5$ h; $t_{1/2}=80$ h) erfolgt.

Dass eine Hemmung der katalytischen Aktivität bzw. eine Reduktion der *PKM2*-Expression in Tumorzellen erstrebenswert ist, belegen mittlerweile mehrere Studien. So konnten Spoden *et al.* ⁽²⁸⁵⁾ in diesem Zusammenhang beispielsweise eine verlangsamte Tumorzellproliferation nach Applikation verschiedener *PKM2*-spezifischer Aptamere zeigen. Andere Autoren beobachteten darüber hinaus eine krebszellspezifische Induktion der Apoptose, eine Reduktion des Tumolvolumens ⁽²⁸⁶⁾ sowie eine verbesserte Wirksamkeit chemotherapeutischer Behandlungsmöglichkeiten *in vivo* ⁽²⁸⁷⁾. Neben den häufig zum Knock-down eingesetzten siRNA-Molekülen konnte eine kürzlich erschienene Studie nun am Beispiel von Resveratrol zeigen, dass auch bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe in der Lage sind, die Expression von *PKM2* und den mit ihr in Verbindung stehenden Tumormetabolismus zu modulieren ⁽²⁸⁸⁾. Die Ergebnisse von Ibaq und Bamezei ⁽²⁸⁸⁾ unterstreichen damit partiell die in dieser Arbeit beobachteten Effekte und geben darüber hinaus Einblicke in den Regulationsmechanismus des Polyphenols. Ob Butyrat die verminderte *PKM2*-Expression ebenso durch eine Hemmung des mTOR-Signalweges vermittelt und/oder andere Mechanismen involviert sind, könnte u. a. Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Für HDAC-Inhibitoren, darunter Butyrat,

wurde darüber hinaus auch eine Beeinflussung onkogener Tyrosinkinasen, wie beispielsweise c-Src ⁽²⁸⁹⁾, demonstriert. Proteine dieser Art bewirken über eine Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste eine Hemmung der Bildung des aktiven PKM2-Tetramerkomplexes, die in der Konsequenz zu einer Reduktion der katalytischen Aktivität führt ⁽⁹²⁾. Die vorliegende Studie konnte zwar einerseits erste Hinweise darauf liefern, dass *PKM2* ein potenzielles Zielgen von Butyrat ist, andererseits wird diese Verbindung durch die dazugehörigen Proteindaten wiederum relativiert. Weiterführende Untersuchungen sind demzufolge unabdingbar und sollten ihren Fokus vor allem auf mögliche Konsequenzen einer reduzierten *PKM2*-Expression für den Tumorstoffwechsel und das Wachstumsverhalten von Kolonkrebszellen richten.

4.2.2 Modulation von Stress- und Entgiftungsenzymen im normalen Kolonepithel

In der Initiationsphase bzw. um eine Initiation zu verhindern, sind vor allem Mechanismen mit detoxifizierender Wirkung gegenüber freien Radikalen, karzinogenen Verbindungen oder toxischen Intermediaten von Bedeutung. Enzyme wie CAT oder SODs spielen eine Schlüsselrolle in der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies, die neben Krebs auch in eine Vielzahl anderer Erkrankungen und dem Alterungsprozess involviert sind. Die Bestimmung der katalytischen Aktivität dieser Enzyme ist daher einer der am häufigsten verwendeten In-vitro-Parameter zur Beurteilung des protektiven Potenzials nahrungsrelevanter Substanzen. Im Unterschied zu anderen Studien, die häufig die SOD-Gesamtaktivität zugrunde legen, haben sich die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich auf die mitochondrial lokalisierte Isoform (SOD2) fokussiert. Diese besitzt eine Schlüsselfunktion beim Schutz der Mitochondrien vor freien Sauerstoffradikalen, welche zu 90 % durch die dort stattfindende Atmungskette generiert werden ⁽²⁹⁰⁾. Superoxidradikale sind dabei die am häufigsten vorkommende Radikalspezies. Sie können durch die Reaktion mit weiteren Molekülen (z. B. Transitionsmetalle) sogenannte sekundäre ROS (z. B. Hydroxy-Radikal) mit hoher Reaktivität bilden ⁽¹³²⁾. Studien an Mäusen haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass eine unzureichende Entgiftung von Superoxidanionen in Folge einer reduzierten SOD2-Aktivität u. a. mit einem Anstieg oxidativer Schäden an der mitochondrialen DNA und Proteinen ⁽²⁹¹⁾ sowie einer Dysfunktion der Mitochondrien und Apoptose (bei chronischer Exposition von Superoxidradikalen) ⁽²⁹²⁾ assoziiert ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikant verminderte *SOD2*-Transkriptmenge in den normalen und malignen Geweben nach Applikation (12 h) von Darmfermentationsprodukten (Butyrat, FÜ Synergy1[®]) (**Publikation IV**). Obwohl die *SOD2*-Proteinmenge durch Butyrat (10 mM) ebenfalls auf das 0,86-fache reduziert wurde, wenn auch nicht signifikant, belegte die Messung der katalytischen Aktivität der *SOD2* eine signifikante Steigerung im normalen Kolonepithel

und lässt hierbei eine kinetische Regulation vermuten. Vorhergehende Untersuchungen von Sauer *et al.* ⁽²⁶⁶⁾ hatten den Einfluss von Butyrat unter den gleichen Inkubationsbedingungen nur auf mRNA-Ebene der SOD2 in primären Kolonozyten detektiert und Konsequenzen für die Proteinexpression und Aktivität unberücksichtigt gelassen.

Für CAT konnte hingegen ein Anstieg der mRNA- und Proteinexpression durch Butyrat im normalen Kolonepithel verzeichnet werden (**Publikation IV**), der sowohl durch eine erhöhte Transkriptionsrate als auch mRNA-Stabilität bedingt sein kann. Ähnliche Beobachtungen machten bereits Yano und Tierney ⁽²⁹³⁾ sowie Sauer *et al.* ⁽²⁶⁶⁾ an glatten Muskelzellen von Ratten bzw. primären Kolonozyten. Rosignoli *et al.* ⁽²⁹⁴⁾ konnten darüber hinaus einen verbesserten Schutz der nukleären DNA beobachten, der vermutlich im Zusammenhang mit einer Zunahme der CAT-Enzymaktivität nach gleicher Behandlungsdauer (2 h) und folglich einer verbesserten Entgiftungskapazität von H₂O₂ steht. Die Untersuchungen von Sauer *et al.* ⁽²⁶⁶⁾ zeigten jedoch auch, dass die Induktion der katalytischen Aktivität nach längeren Inkubationsperioden mit Butyrat deutlich geringer ausfiel (65 % nach 2 h bzw. 10 % nach 8 h). Diese Beobachtung könnte zum einen den ausbleibenden Anstieg der CAT-Aktivität nach 12 h Inkubation in dieser Arbeit erklären, der in der Folge auch keinen Schutz vor der Exposition mit H₂O₂ bot. Zum anderen deuten die Ergebnisse von Sauer *et al.* ⁽²⁶⁶⁾ zusammen mit den hier generierten Daten aber auch auf eine möglicherweise transiente Wirkung von Butyrat auf Epithelzellen des Kolons hin. Demnach wäre eine regelmäßige und ausreichende Ballaststoffaufnahme notwendig, um eine nachhaltige Hochregulation der CAT im Kolonepithel *in vivo* zu erzielen und damit möglicherweise einen verbesserten zellulären Schutz.

Ähnlich wie Butyrat bewirken auch komplexe Fermentationsüberstände Veränderungen der Expression und Aktivität antioxidativer Enzymsysteme, wie vorhergehende und eigene Untersuchungen belegen (**Weitere Ergebnisse**). Stein *et al.* ⁽²⁹⁵⁾ konnten beispielsweise eine Induktion der CAT nach Applikation eines FÜ des Weizenaleurons in Kolonkarzinomzellen beobachten. In primären Kolonepithelzellen wurde eine derartige Wirkung bisher nur für den dazugehörigen FÜ Blank (ohne Zusatz von Weizenaleuron) gezeigt. Die vorliegende Studie konnte zwar Modulationen sowohl der CAT- als auch SOD2-Transkriptmenge durch FÜ Synergy1[®] nachweisen, jedoch ohne messbare Veränderungen der dazugehörigen Proteinexpression oder Aktivität, was mitunter durch die limitierte Probenanzahl (≤ 10) und/oder die zu großen Variationen zwischen den Spendern bedingt war.

Da sowohl Butyrat als auch der komplexe FÜ vergleichbare Wirkungen auf die antioxidativen Enzyme (mRNA) hatten, kann zum einen geschlossen werden, was auch Borowicki *et al.* ⁽²⁹⁶⁾ beim Einsatz vergleichbarer Butyrat-Mengen (FÜ,

Einzelsubstanz) postulierten, dass die beobachteten Effekte hauptsächlich auf Butyrat zurückzuführen sind. Zum anderen sind allerdings auch synergistische Effekte anderer bakterieller Fermentationsprodukte, wie z. B. Propionat oder Azetat, denkbar, da der komplexe FÜ nur etwa 3 mM Butyrat und damit deutlich weniger als beim Einsatz der Einzelsubstanz (10 mM) enthielt.

Dass eine Verbesserung des antioxidativen Schutzes durch die Aufnahme nahrungsrelevanter Substanzen die Anzahl und das Wachstum kolorektaler Läsionen unterdrücken bzw. reduzieren kann, wurde *in vivo* bereits in einigen Studien belegt ^(145,146). In Tumoren ist eine Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzymsysteme jedoch eher von Nachteil. Ergebnissen von Huang *et al.* ⁽²⁹⁷⁾ zufolge ist die Überexpression der SOD2 mit einem „Schutzschild“ vergleichbar, welches malignen Zellen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativen Stressleveln verleiht und auf diese Weise das Tumorstadium begünstigt. Im Einklang mit diesen Daten befinden sich auch Untersuchungen von Janssen *et al.* ⁽²²⁵⁾ und Toh *et al.* ⁽²⁹⁸⁾, die einen positiven bzw. negativen Zusammenhang zwischen SOD2-Überexpression und der Aggressivität kolorektaler Tumore bzw. der 5-Jahres-Überlebensrate von Krebspatienten festgestellt haben.

Darmfermentationsprodukte zeigten in dieser Arbeit zwar ein Potenzial zur Reduktion der SOD2 mRNA-Expression in Tumoren, signifikante oder tendenzielle Veränderungen des Protein- und/oder Aktivitätsniveaus blieben nach der bisherigen Anzahl an untersuchten Patienten jedoch aus. Eventuelle tumorinhibierende Eigenschaften von kurzkettigen Fettsäuren, die als Unterstützung zu therapeutischen Maßnahmen in Form einer gezielten Ernährung relevant wären, müssten folglich in weiteren Untersuchungen unter Verwendung eines größeren Probandenkollektivs evaluiert werden. Eine Senkung der SOD2-Expression und -Aktivität könnte nicht nur die Prognose von Kolonkrebepatienten verbessern, sondern auch die Resistenz der Tumorzellen gegenüber konventionellen Therapiemaßnahmen, wie Bestrahlung und Chemotherapie, vermindern ⁽²⁹⁹⁾.

Im Vergleich zu SOD2 wäre eine Zunahme der CAT-Aktivität in Tumorzellen jedoch erstrebenswert, da H₂O₂ als Signalmolekül im Prozess der Metastasierung eine Rolle spielt ^(141,142,300). Primäre Brusttumore transgener Mäuse, die CAT gezielt in den Mitochondrien exprimieren, zeigten beispielsweise ein geringeres Invasionsverhalten, trotz gleicher Inzidenz der Ursprungstumore ⁽³⁰¹⁾. Ähnliche Effekte konnten auch für experimentell induzierte Lungenmetastasen nach Applikation verschiedener CAT-Derivate *in vivo* beobachtet werden ⁽¹⁴⁸⁾. Allerdings erzielte weder die Behandlung mit Butyrat noch mit FÜ Synergy1[®] eine Modulation des antioxidativen Enzyms im Tumorgewebe des Kolons. Die vorliegenden Daten dieser Arbeit limitieren demzufolge die Wirkung von Fermentationsprodukten im Rahmen der chemopräventiven Aktivität auf normale

Kolonzellen. Eine mögliche Ursache der vermeintlich höheren Empfindlichkeit des normalen Kolonepithels könnte in der Butyrataufnahme durch die Epithelzellen liegen. Lambert und Kollegen ⁽³⁰²⁾ haben gezeigt, dass diese eine deutlich stärkere Expression des Butyrat-Transporters MCT1 im Vergleich zu malignen Zellen aufweisen. Die erhöhte Empfindlichkeit des gesunden Gewebes wurde in dieser Arbeit neben der Induktion von CAT ebenso anhand der gesteigerten Expression von *GSTP1* sowie der Aktivität von SOD2 sichtbar.

Der Definition der Chemoprävention zufolge zählen neben dem gesunden Kolonepithel ebenso prä-maligne Läsionen, wie aberrante Krypten, Polypen oder frühe Adenome zu den Zielgeweben chemopräventiver Maßnahmen ⁽³⁰³⁾. Bedingt durch die geringe Anzahl an Adenomproben, die als Zufallsbefunde entdeckt worden waren, sowie fehlende Literaturdaten kann bisher keine abschließende Einschätzung vorgenommen werden, wie mögliche Änderungen des antioxidativen Status in intermediären Kolonkarzinogenesestadien zu bewerten sind und welche Konsequenzen sie nach sich ziehen. Unter Berücksichtigung der verringerten basalen Aktivitäten von SOD2 und CAT, die nahezu einheitlich in allen in dieser Arbeit untersuchten Kolonadenomen im Vergleich zum Normalgewebe gefunden wurden, könnte davon ausgegangen werden, dass eine Stimulation dieser Enzymsysteme durch Fermentationsprodukte wie Butyrat möglicherweise die zelluläre Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies wieder erhöht bzw. normalisiert und damit einer weiteren Entartung des Gewebes entgegenwirkt. Eine solche Induktion ließ sich hier am Beispiel der SOD2-Aktivität feststellen.

Neben den Konsequenzen eines veränderten antioxidativen Status in malignen und nicht-malignen Kolongewebeproben sind ebenso die regulatorischen Mechanismen, über die Butyrat und ev. andere SCFAs antioxidative Enzyme wie CAT oder SOD2 modulieren, bis heute nicht bekannt. Ein wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen könnte hierbei die HDAC-inhibitorische Aktivität von Butyrat sein. Verschiedene Studien weisen beispielsweise darauf hin, dass die Expression und Aktivität der Mangan-haltigen SOD2 u. a. durch die regulatorische Aktivität von Histondeacetylasen beeinflusst wird ⁽³⁰⁴⁾.

Neben antioxidativen Enzymen wie CAT oder SOD2 gelten vor allem die Enzyme der Familie der GSTs als wichtige Ziele in der Primärprävention kolorektaler Karzinome. Die Induzierbarkeit spezifischer GSTs durch Darmfermentationsprodukte oder andere nahrungsrelevante Substanzen wurde *in vitro* durch zahlreiche Untersuchungen an Tumorzelllinien belegt und ist u. a. mit einem erhöhten zellulären Schutz gegen das genotoxisch wirkende Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxynonenal (GSTA4-4) oder Cumenhydroperoxid (GST2) assoziiert ^(305,306). Das Anschalten ähnlicher Mechanismen in nicht-transformierten Kolonzellen ist dabei von besonderem Interesse, um der Initiation von Tumoren entgegen zu wirken. Butyrat (10 mM, 12 h) führte in diesem

Zusammenhang auf mRNA-Ebene zu einer Induktion der GST-Isoenzyme *P1* und *M2* in primären Kolonozyten (**Weitere Ergebnisse**), die durch Sauer *et al.* ⁽²⁶⁷⁾ in einer initialen Studie mit geringerer Spenderzahl ebenso gezeigt werden konnte. Hinweise auf eine Regulation durch Butyrat lieferten zuvor Studien mit HT29-Tumorzellen und LT97-Adenomzellen, die meist mit geringeren Butyrat-Konzentrationen (2-4 mM) über längere Zeiträume (24-72 h) zur Simulation einer dauerhaften Exposition behandelt worden waren. Primäre Kolonzellen sind bisher nur max. 12 h kultivierbar, was wiederum nicht ausschließt, dass die fehlenden Veränderungen der GST-Proteine zu einem späteren Zeitpunkt in Erscheinung treten. Im Unterschied zur Transkriptions- und Proteinebene wurde nach 12 h eine leichte, jedoch signifikante Reduktion der GST-Gesamtaktivität in normalen Kolonzellen (n=10 Spender) durch Butyrat verzeichnet. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Sauer *et al.* ⁽²¹⁰⁾, die ihre Messungen mit nur 3 Spendern durchführten. Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass die GST-Aktivität zum einen nur die Konjugation von Glutathion mit CDNB reflektiert und zum anderen diese Reaktion durch einige Isoenzyme mit unterschiedlicher Effektivität katalysiert wird, ist der Parameter „GST-Gesamtaktivität“ allein keine ausreichend verlässliche Größe, um Veränderungen des GST-Systems anzuzeigen ⁽¹⁸⁰⁾. Glutathion wurde beispielsweise ebenso in erhöhter Menge nach der Inkubation (72 h) mit Butyrat (4 mM) in HT29-Zellen detektiert ⁽³⁰⁵⁾. Demnach bestimmt der gegenseitige Einfluss aller 3 Parameter (GST-Isoenzym-Konzentration, GSH-Konzentration, Substratspezifität) die GST-Gesamtaktivität in Zellen ⁽¹⁸⁰⁾.

In gesunden und anfänglich veränderten Darmzellen gilt eine Hochregulation der GST-Expression und -Aktivität als ein vorteilhafter Mechanismus, der mit einem erhöhten Schutz vor Karzinogenen und folglich der Senkung des Risikos für die Initiation oder Progression von Tumoren assoziiert ist. APC^{min}-Mäuse mit einem *GSTP1*-Null Phänotyp wiesen beispielsweise häufiger und mehr Adenome auf als ihre Wildtyp-Artgenossen, die höhere Überlebensraten zeigten ⁽³⁰⁷⁾. Unter bestimmten Voraussetzungen können jedoch auch verminderte Aktivitäten einzelner GST-Isoenzyme von Vorteil sein, wie am Beispiel von Isothiocyanaten gezeigt wurde. GSTs spielen eine primäre Rolle im Metabolismus dieser bioaktiven Verbindungen, welche als Hauptmediatoren der chemopräventiven Wirkung von Gemüsearten der Kreuzblütengewächse gelten ⁽³⁰⁸⁾. Dabei wird angenommen, dass Individuen mit einem GST-Nullpolymorphismus Isothiocyanate weniger effizient verstoffwechseln und auf diese Weise stärker von der chemopräventiven Wirkung der aufgenommenen Kohlgemüse profitieren. Ein derartiger Zusammenhang ließ sich beispielsweise bei Trägern mit einer homozygoten Deletion des *GSTM1*- und/oder *GSTT1*-Gens feststellen. Diese wiesen aufgrund der vermutlich geringeren urinären Ausscheidung an Isothiocyanaten ein geringeres Risiko, an Kolorektalkrebs zu erkranken,

auf ⁽³⁰⁹⁾. Da die Entgiftungskapazität nur eine von vielen Funktionen der Enzyme ist, können Veränderungen bezüglich des GST-Expressions- und Aktivitätsmusters unter anderen Umständen auch nachteilige Auswirkungen haben ⁽¹⁸⁰⁾. Neben der Detoxifizierung potenzieller Karzinogene und einer Reduktion potenziell chemopräventiver Verbindungen kann die von einigen GST-Enzymen katalysierte Konjugation mit GSH substratabhängig auch eine Giftung von Substanzen bewirken. Dichlormethan beispielsweise wird u. a. durch die katalytische Aktivität der GSTT1 verstoffwechselt und führt in Säugerzellen zu DNA-Veränderungen, die vermutlich auf das Reaktionsprodukt Formaldehyd zurückzuführen sind ⁽³¹⁰⁾. Die resultierenden Effekte einer veränderten GST-Expression und -Aktivität sollten deshalb für Zellen und Organismen in weiteren Experimenten kritisch betrachtet werden.

Im Tumor- und womöglich auch Adenomgewebe fördert eine Überexpression der *GSTP1* unter Stressbedingungen über verschiedene Mechanismen das klonogene Wachstum und Überleben der Zellen *in vitro* ⁽³¹¹⁾. Angesichts dieser Konsequenzen wäre eine Induktion von GSTs, insbesondere *GSTP1*, in Kolonkarzinomen nicht vorteilhaft und stellt zusätzlich einen Faktor dar, der zu Resistenzen gegen Zytostatika beitragen kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bezüglich der GST-Regulation haben jedoch weder einen signifikanten Einfluss auf *GSTP1* noch auf die GST-Gesamtaktivität im Tumorgewebe erkennen lassen. Für *GSTM2* wurde hingegen ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression festgestellt, der sich auf zellulärer Ebene möglicherweise in einer Zunahme der Differenzierung von Tumorzellen äußern könnte. Auf Proteinebene des Enzyms wurde der Anstieg bisher allerdings nicht beobachtet. Untersuchungen von Tang und Kollegen hatten an gepaartem Lungenkrebsgewebe und angrenzendem Normalgewebe gezeigt, dass schlecht differenzierte Tumore im Vergleich zu gut und mäßig differenzierten Tumoren weniger *GSTM2*-mRNA-Moleküle aufweisen ⁽¹⁷²⁾. Wenngleich die Induktion einzelner GST-Isoenzyme in Tumoren möglicherweise mit positiven Wirkungen assoziiert sein könnte, sind letztendlich die Gesamtveränderung des GST-Systems und die damit einhergehenden Konsequenzen für die Zellen von entscheidender Bedeutung.

Der genaue Mechanismus über den Butyrat bzw. andere Darmfermentationsprodukte im Darm eine Erhöhung der *GSTP1*- und *GSTM2*-Expression hervorrufen, ist bislang nicht genau bekannt und womöglich vom Transformationsgrad der Zellen abhängig. Während die Regulation von GST-Isoenzymen in normalen Zellen u. a. über den Transkriptionsfaktor Nrf2 erfolgt ⁽³¹²⁾, sind in Krebszellen vor allem Mechanismen der posttranslationalen Modifikation von Histonen beschrieben ^(313,314). Intrazelluläre Kinasen stellen in diesem Zusammenhang zudem weitere potenzielle Angriffsziele von Butyrat dar. So berichteten frühere Arbeiten beispielsweise über eine Erhöhung der Phosphorylierung

der ERK nach Butyrat-Inkubation von HT29 und HT29 Klon19A-Tumorzellen⁽³⁰⁵⁾. Als Teil der MAPKinase Signalkaskade ist die ERK-Familie eine von 3 Proteinkinasen, welche durch eine Phosphorylierungskaskade aktiviert werden und wichtige zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Überleben, kontrollieren. ERKs phosphorylieren und stimulieren die Aktivität vieler nuklearer Transkriptionsfaktoren, darunter u. a. AP-1⁽³¹⁵⁾. Da verschiedene *GST*-Gene (z. B. *GSTA1*, *GSTP1*) eine Bindungsstelle für diesen Transkriptionsfaktor in ihrer Promotorsequenz enthalten, wird eine Beteiligung des MAP-Kinase Signalweges an der Induktion der *GSTs* durch Butyrat vermutet⁽¹⁸⁰⁾. Unterlegt werden kann diese Hypothese beispielsweise mit Ergebnissen anderer Autoren, die u. a. eine Erhöhung der AP-1 Genaktivität in Reporterassays nach Butyrat-Applikation gezeigt haben⁽³¹⁶⁾. Im Hinblick auf *GSTM2* könnten ferner Mechanismen, die Veränderungen im Methylierungsmuster des Gens bewirken, von Bedeutung sein, da das Isoenzym bedingt durch einen erhöhten Methylierungsstatus der DNA in vielen Tumoren häufig in geringerer Menge vorgefunden wurde⁽¹⁷⁰⁻¹⁷²⁾. Hinweise dazu liefern beispielsweise Untersuchungen von Sarkar und Kollegen⁽³¹⁷⁾, die eine Reduktion oder Aufhebung der Methylierung von CpG-Motiven in den Abwärts-Regionen stillgelegter Gen-Promotoren durch eine Herunterregulierung der DNA-Methyltransferase 1 in Prostatakrebszellen nach Inkubation mit Butyrat beobachtet haben. Ob die Regulation der *GST*-Expression in humanen Kolonzellen tatsächlich über die genannten Mechanismen erfolgt und möglicherweise Unterschiede zwischen normalen und transformierten Zellen zu erwarten sind, stellt einen wichtigen Schwerpunkt für nachfolgende Untersuchungen dar. Zukünftige Arbeiten sollten darüber hinaus die Mechanismen der protektiven Wirkung von Ballstoffen aufklären, welche aufgrund der erhöhten Butyratbildung im Dickdarm möglicherweise gleiche Induktionswege nutzen.

4.2.3 Modulation der alpha-Defensin Expression

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein tendenzieller Anstieg der mRNA-Expression des enterischen alpha-Defensins HD6, einem möglicherweise weiterem zellulären Abwehrmechanismus, in epithelialen Kolonzellen nach Butyrat-Exposition gezeigt werden (**Weitere Ergebnisse**). Welche Konsequenzen mit dieser Erhöhung auf funktionaler Ebene assoziiert sind, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Am Beispiel von beta-Defensinen wurde bereits gezeigt, dass eine Induktion durch kurzkettige Fettsäuren, darunter Butyrat, u. a. mit einem verbesserten Schutz von Epithelien vor Infektionen und Entzündungen einhergeht⁽³¹⁸⁾.

Mit vermutlich anderer Bedeutung werden die enterischen alpha-Defensine im Verlauf der Tumorentstehung verstärkt produziert. Die erhöhte Expression von *DEFA6*, die sehr wahrscheinlich die Folge eines deregulierten Wnt-Signalweges ist⁽³¹⁾, legt hierbei eine

tumorfördernde Wirkung nahe. Eine Inhibierung der *DEFA6*-Expression und Sekretion des dazugehörigen Peptids könnten folglich zu einer Eindämmung des Tumorwachstums beitragen. Im Unterschied zum normalen Kolonepithel lassen die bisherigen Ergebnisse von 11 Spendern jedoch keine regulatorische Wirkung von Butyrat auf die Transkriptmenge von *DEFA6* im kolorektalen Tumorgewebe erkennen (**Weitere Ergebnisse**). Um zukünftig mögliche Effekte von Darmfermentationsprodukten oder anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen besser beurteilen zu können, sollten nachfolgende Untersuchungen ihren Fokus zunächst auf die Rolle der enterischen alpha-Defensine in der Kolonkarzinogenese legen.

HNP1-3 stellen wichtige Mediatoren in entzündlichen Prozessen da ⁽³¹⁹⁾, welche beispielsweise in Form der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa das Risiko für eine maligne Transformation erhöhen. Die gesteigerte Expression der antimikrobiellen Peptide in kolorektalen Tumoren könnte dabei ein Marker für den vermuteten kausalen Zusammenhang zwischen Inflammation und Kolorektalkrebs sein. HNP1-3 verfügen über zahlreiche proinflammatorische Eigenschaften, die sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort beeinflussen. In geringeren Konzentrationen erhöhen sie u. a. die Sekretion von Zyto- bzw. Chemokinen wie Interleukin (IL)-8, Makrophagen-Chemoattraktorprotein 1 und Tumornekrosefaktor-alpha, während die Produktion antiinflammatorischer Faktoren wie IL-10 vermindert wird ^(117,320,321). Zudem konnte eine regulatorische Aktivität gegenüber verschiedenen Immunzellen (Natürliche Killerzellen, CD4 positive Zellen) ⁽¹²²⁾ sowie die Bindung von humanen Leukozyten Antigen (HLA)-Molekülen beobachtet werden ⁽¹²¹⁾. Hohe Konzentrationen an HNP1-3 werden hingegen mit apoptotischen bzw. zytotoxischen Effekten in Verbindung gebracht ^(123,124,321) und könnten zusammen mit anderen Faktoren für das Auftreten nekrotischer Areale ⁽¹²¹⁾, welche in Tumoren häufig zu finden sind, verantwortlich sein. Trotz immunhistochemischer Hinweise auf eine partielle Produktion durch Tumorzellen ^(119,121), ist davon auszugehen, dass die Synthese von HNP1-3 überwiegend durch tumorinfiltrierende Neutrophile erfolgt ⁽¹²²⁾. Liu *et al.* ⁽³²¹⁾ haben in diesem Zusammenhang eine „Einwanderung“ exogen applizierter alpha-Defensine in Epithelzellen *in vitro* gezeigt, die mitunter ursächlich für die in Tumorzellen lokalisierten Peptide sein könnte. Eine anhaltende Expression der proinflammatorischen Mediatoren würde folglich dazu beitragen, entzündliche Prozesse in der Tumorumgebung sowie direkte Wirkungen gegenüber Krebszellen zu fördern. Die Produktion von HNP1-3 könnte dabei ferner einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Präventions- und Behandlungsstrategien darstellen. Darmfermentationsprodukte wie Butyrat wären aufgrund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften potenzielle Substanzen, die möglicherweise in der Lage sind, Einfluss auf HNP1-3 assoziierte Prozesse zu nehmen.

Initiale Untersuchungen dieser Arbeit an Kolontumorgewebe konnten bisher jedoch keine Modulation der *DEFA1-3* Transkriptmenge durch Butyrat feststellen und bedürfen weiterer Analysen mit einem größeren Probandenkollektiv (**Weitere Ergebnisse**).

Dass eine gezielte Expression von alpha-Defensinen in Tumoren auch gegen das Wachstum maligner Läsionen eingesetzt werden kann, zeigten u. a. Studien von Wang *et al.* ⁽³²²⁾ und Xu *et al.* ⁽³²³⁾. Beide Gruppen konnten dabei eine Reduktion des Tumorwachstums in verschiedenen Xenograft-Mausmodellen nach Applikation eines HNP1-exprimierenden Plasmidkonstrukts beobachten. Die damit einhergehenden akuten immunologischen Veränderungen scheinen sich hierbei zugunsten einer effektiveren Immunabwehr gegen Tumorzellen auszuwirken und könnten eine weitere Möglichkeit zur Behandlung von Tumorerkrankungen eröffnen.

4.3 Korrelation der mRNA- und Proteinexpression ausgewählter Gene im humanen Kolongewebe

Die Erfassung individueller Veränderungen von Genen und deren korrespondierenden Proteinen ermöglicht zum einen eine Identifizierung von Genen, die transkriptionell reguliert werden, und zum anderen Einblicke in die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen. Die Expression eines Gens kann dabei sowohl durch transkriptionelle als auch translationale Mechanismen reguliert werden. Viele Studien verwenden fälschlicherweise oftmals die mRNA-Expression als „Ersatz“ für die Menge des dazugehörigen Proteins. Dass eine Korrelation zwischen beiden Parametern nicht in jedem Fall gegeben ist, konnten bereits verschiedene Untersuchungen zur basalen Expression einer Vielzahl an Genen in Hefen und humanen Zellen bzw. Geweben deutlich zeigen ^(230,231,324). Einer Analyse von Tian *et al.* ⁽³²⁵⁾ zufolge, sind die Proteinmengen nur zu 40 % auf transkriptionelle Veränderungen zurückzuführen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen befindet sich auch die vorliegende Analyse, die neben der basalen mRNA-Protein-Korrelation erstmals die Abhängigkeiten der Veränderungen nach Butyrat-Applikation untersucht hat.

4.3.1 Korrelation der basalen mRNA- und Proteinexpressionswerte

In Kolontumoren konnte lediglich für die *SOD2* ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen Gen- und Proteinexpression ermittelt werden ($r=0,63$, $p<0,05$), der eine transkriptionelle Regulation des Proteins vermuten lässt. Bereits Chen und Kollegen ⁽²³⁰⁾ hatten einen ähnlichen Zusammenhang für die zytosolische CuZn-haltige SOD-Isoform (*SOD1*) in Lungenkarzinomen beschrieben. Bei den übrigen Genen, die aufgrund ausreichend verfügbarer Daten diese Analyse ermöglicht haben, wurde dagegen nur in 30-65 % der untersuchten Patientenproben eine gleichgerichtete Änderung der

individuellen Gen- und Proteinexpressionswerte gefunden. Interessanterweise identifizierte ein nachfolgender Vergleich der medianen mRNA- und Proteinexpression jedes Gens darüber hinaus einen Anstieg der *PKM2*-Transkriptmenge in Kolontumoren, der in ähnlichem Ausmaß auch auf Proteinebene des Enzyms beobachtet werden konnte und, vergleichbar mit *SOD2*, auf eine transkriptionelle Regulation schließen lässt.

Für *HSP90 β* und *GSTP1* konnten sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in anderen Untersuchungen ^(222,230) keine Korrelationen zwischen dem Transkript- und Proteinlevel nachgewiesen werden. Eine zuvor durchgeführte Studie von Radeva ⁽²²²⁾ hatte ähnlich wie in dieser Arbeit eine mediane Erhöhung der *HSP90 β* -Genexpression um den Faktor 2,97 (hier 1,84) in humanem Kolontumorgewebe angezeigt, während keine Veränderungen auf Proteinebene (median: 1,00-fach (Radeva), 0,92 (hier)) feststellbar waren. Diese Ergebnisse könnten somit auf das Vorliegen eines posttranskriptionellen Mechanismus zur Regulation der Expression beider Proteine schließen lassen.

In Bezug auf die Differenzen zwischen Gen- und Proteinexpression hatten andere Autoren unter Verwendung unterschiedlicher Zellen bzw. Gewebe und größerer Probandenkollektive zuvor bereits ähnliche Entdeckungen gemacht und konnten nur für einen Teil der analysierten Gene eine Korrelation mit der dazugehörigen Proteinmenge feststellen, obwohl ein Gesamtzusammenhang zwischen beiden Expressionsebenen unbestritten ist ^(230,231,326). Mögliche Faktoren, die hierauf Einfluss nehmen können, werden allgemein und zusammen mit den potenziellen Ursachen für Veränderungen des Gen- und Proteinexpressionsniveaus infolge einer Butyrat-Behandlung am Ende des nachfolgenden Abschnittes diskutiert.

4.3.2 Korrelation der Veränderungen auf mRNA- und Proteinebene im Kolon-gewebe nach Butyrat-Inkubation

Neben einem Vergleich der basalen mRNA- und Proteinmengen gewährt die vorliegende Arbeit des Weiteren Einblicke in die Veränderungen der Korrelationen einzelner Gene und Proteine unter experimentellen Bedingungen. Vergleichbar wenig signifikante Korrelationen ließen sich nach 12 h Butyrat-Behandlung der Normal- und Tumorgewebe bei einer direkten Gegenüberstellung der gepaarten mRNA- und Proteinexpressionsveränderungen der einzelnen Gene identifizieren. Davon eingeschlossen war die Expression des *HSP90 β* im Tumorgewebe, dessen Variation auf Proteinebene zu etwa 50 % mit Hilfe des Transkriptlevels erklärt werden kann. Bei Betrachtung der übrigen Gene zeigte sich, dass 30-77 % der analysierten Spender eine gleichgerichtete Änderung ihres mRNA- und Proteinexpressionslevels im Normal- und Tumorgewebe nach Exposition mit Butyrat aufwiesen. Obwohl mit Ausnahme von *HSP90 β* im Tumorgewebe für keines der in dieser Arbeit untersuchten Gene ein signifikanter Zusammenhang zwischen der individuellen Gen- und Proteinexpression

identifiziert werden konnte, wurden Übereinstimmungen bei einem Vergleich der medianen Veränderungen nach Butyrat-Behandlung sichtbar. So wurden bei *GSTP1*, *CAT* und *SOD2* jeweils gleichgerichtete bzw. sehr ähnliche mRNA- und Proteinlevel im Normal- und Tumorgewebe verzeichnet, die außerdem für *HSP90 β* , *COX-2* und *OPN* im Tumorgewebe gezeigt werden konnten. Eine nachfolgende Korrelationsanalyse bestätigte den augenscheinlichen Zusammenhang für diese Gene ($r=0,89$, $p<0,01$) und lässt eine transkriptionelle Regulierung vermuten.

Trotz der Existenz weiterer Mechanismen zur Kontrolle der Translation belegten Guo und Kollegen ⁽²³¹⁾ anhand einer umfassenden Analyse von 71 Genen in zirkulierenden Monozyten (30 Spender) einen Gesamtzusammenhang zwischen der Genexpression und der Menge der dazugehörigen Proteine. Eine Klassifizierung der Gene nach den Gen-Ontologie-Prinzipien hatte hierbei allerdings eine Diskrepanz zwischen den mRNA- und Proteinleveln von Genen der Kategorien „Regulation“ und „Entwicklung“ angezeigt, welche möglicherweise auf die Funktion der Gene und ev. verschiedene translationale Regulationsmechanismen im Vergleich zu anderen Zelltypen zurückgeführt wurde. Eine starke Korrelation konnte beispielsweise für Gene mit Lokalisation im extrazellulären Kompartiment oder mit katalytischer oder signalübermittelnder Aktivität identifiziert werden ⁽²³¹⁾.

Für die individuellen Unterschiede zwischen Gen- und Proteinexpression werden in der Literatur verschiedene Faktoren diskutiert. Eine nicht unerhebliche Rolle spielt hierbei die Verwendung von humanen Gewebeproben, die auch in dieser Arbeit das Ausgangsmaterial der Untersuchungen bildeten. Insbesondere solide Tumore weisen eine sehr heterogene Struktur auf und bestehen zu unterschiedlichen Anteilen aus verschiedenen Zelltypen (z. B. Tumorzellen, Tumorstammzellen, Tumor-assoziierte Fibroblasten, Immunzellen) ^(26,327,328). Da die Genexpressions- und proteinbiochemischen Untersuchungen jedoch nur mit verschiedenen Gewebestückchen der gleichen Probe durchgeführt werden können, sind Diskrepanzen zwischen beiden Parametern nicht auszuschließen. Eine Studie von Bryant *et al.* ⁽³²⁹⁾ zeigte in diesem Zusammenhang am Beispiel einer heterogenen Zellpopulation wie peripheren mononukleären Blutzellen, dass in Abhängigkeit des zu untersuchenden Zielgens, die Nicht-Zielzellen (Nicht-Monozyten-Fraktion) einen „verschleiernenden“ oder „verdünnenden“ Effekt auf die Expression in den eigentlichen Zielzellen (hier: Monozyten) haben können.

Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression nehmen können, sind neben den verwendeten Methoden vor allem biologische Prozesse, wie beispielsweise die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen, posttranskriptionelle Modifikationen, eine translationale Regulation, posttranslationale Proteinveränderungen oder der Abbau von Proteinen ^(231,330). Unbekannt ist hierbei ebenso, wie sich die

experimentellen Bedingungen auf diese zellulären Vorgänge auswirken. In dieser Arbeit wurde bei nahezu allen untersuchten Genen eine Beeinflussung der mRNA-Expression durch die Kultivierung festgestellt, die sich jedoch nicht zeitgleich auf Protein- und/oder Aktivitätsebene widerspiegelt hat. Hinzu kommt, dass bei den mit Butyrat-behandelten Proben eine zeitliche Verzögerung zwischen Transkription und Translation oder Translation und Aktivierung der Proteinaktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Eine 12-stündige Exposition der humanen Kolongewebeproben mit *in vitro* gewonnenen Fermentationsprodukten ist möglicherweise zu kurz, um die auf mRNA-Expressionsebene beobachteten Veränderungen auf Protein- und Aktivitätsebene detektieren zu können. Andererseits könnte die gewählte Inkubationsdauer auch zu lang sein, wenn entsprechende Modulationen des Protein- und Aktivitätsniveaus nur von transienter Natur sind wie möglicherweise für CAT zutreffend ⁽²⁶⁶⁾. Weiterführende Untersuchungen sollten deshalb durch variierende Expositionszeiten die Kinetik der Veränderungen auf allen drei Expressionsebenen aufklären. Voraussetzung hierfür ist eine weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen primärer Kolonepithelzellen. Neben all den genannten Faktoren stellt auch die Größe des Probenumfangs einen limitierenden Faktor bei der Identifikation von signifikanten Korrelationen des mRNA- und Proteinexpressionsniveaus dar. Die relativ geringe Anzahl an Gewebeproben, die im Projektzeitraum zur Verfügung standen, wurde für die Untersuchungen zur Proteinexpression nochmals reduziert und könnte somit die Aussagekraft der statistischen Analyse begrenzt haben. Ein Indiz hierfür sind möglicherweise die Korrelationen der medianen Gen- und Proteinexpressionsveränderungen, die bei einigen Genen im Normal- und Tumorgewebe nach Butyrat-Behandlung in dieser Arbeit gefunden wurden.

Welche Faktoren im Einzelnen bei den in dieser Arbeit untersuchten Genen relevant für die Stärke der Korrelation von Gen und Protein bzw. Protein und Aktivität sein könnten, wurde in den entsprechenden Kapiteln der Diskussion dargelegt.

4.4 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Die Expression und/oder Aktivität von *OPN*, *COX-2*, *PKM2*, *HSP90 β* , *GSTP1*, *GSTM2*, *SOD2* und *CAT* im humanen Kolonepithel unterliegt einer großen interindividuellen Variation. Die Einbeziehung zusätzlicher Spender-Daten, wie z. B. Ernährungsgewohnheiten, Raucherstatus oder genetische Polymorphismen, könnte zukünftig zur Aufklärung der zugrundeliegenden Ursachen beitragen.

- Für die antioxidativ wirksamen Enzyme SOD2 und CAT wurde das Alter als ein wichtiger Einflussfaktor in Bezug auf die katalytische Aktivität identifiziert. Während diese im normalen Kolonepithel mit zunehmendem Alter der Spender abnimmt, konnte für die Expression der übrigen Gene keine Korrelation festgestellt werden.
- Alle in dieser Arbeit untersuchten Gene (*DEFA1-3*, *DEFA6*, *OPN*, *COX-2*, *PKM2*, *HSP90 β* , *CAT*, *SOD2*, *GSTP1*, *GSTM2*) zeigen ein differenzielles mRNA-Expressionsmuster in normalem und malignem Kolongewebe. Die veränderte Expression lässt dabei auf fehlregulierte Signaltransduktionswege schließen, wie beispielsweise den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Während die Mehrzahl der Gene dabei überexprimiert in Kolontumoren gefunden wurde, konnten für *CAT* und *GSTM2* verminderte Transkriptmengen festgestellt werden.
- Kolonadenome weisen erhöhte mRNA-Expressionslevel von *PKM2* und *alpha-Defensinen* auf, was ein Hinweis auf eine möglicherweise frühe Beteiligung der korrespondierenden Proteine an der Kanzerogenese ist.
- Die hierbei extrem hohe *DEFA6*-Transkriptmenge besitzt das Potenzial, prämaligne Tumorstadien mit hoher Wahrscheinlichkeit zu identifizieren und so als ein neuer Marker in der Diagnostik Anwendung zu finden.
- Die mRNA-Expression von *PKM2* steigt mit zunehmender Dedifferenzierung des Kolontumorgewebes an, was ein Hinweis auf Veränderungen im Zellstoffwechsel sein kann.
- Männer weisen im Vergleich zu Frauen eine tendenziell erhöhte mRNA-Expression des *COX-2* Gens auf. Diese Tatsache könnte zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden im Hinblick auf die Inzidenz kolorektaler Tumore beitragen.
- Die erhöhten Expressionsmengen von *PKM2* und *SOD2* in Tumoren sind auch auf Proteinebene der Enzyme nachweisbar und deuten damit auf eine transkriptionelle Regulation der Proteine hin.
- Butyrat bewirkt auf mRNA-Ebene im Normal- und Tumorgewebe eine Reduktion der tumorpromovierenden Proteine COX-2 und OPN. Tumore mit einer geringeren *OPN*-Transkriptmenge reagierten dabei empfindlicher auf die kurzkettige Fettsäure (stärkere Reduktion) im Vergleich zu solchen mit einer höheren Ausgangsmenge. Der

umgekehrte Fall ließ sich für *COX-2* im Normalgewebe beobachten: Epithelien mit einem niedrigen basalen Transkriptlevel zeigten vergleichsweise nur geringe Veränderungen der *COX-2* mRNA.

- Trotz der verminderten *COX-2* Transkriptmengen tritt im Normal- und Tumorgewebe nur eine marginale Reduktion der Sekretion des PGE_2 (Hauptmediator der *COX-2*) auf.
- Die Exposition der gesunden Kolonmukosa mit Butyrat bewirkt eine Erhöhung des mRNA- und Proteinlevels von *CAT* ohne einen parallelen Anstieg der katalytischen Aktivität. Ein erhöhter zellulärer Schutz gegenüber oxidativem Stress, induziert durch H_2O_2 , war deshalb bisher nicht feststellbar.
- Trotz einer Reduktion der mRNA- und in geringerem Ausmaß auch der Proteinexpression von *SOD2* führt Butyrat zu einer Erhöhung der Aktivität des mitochondrialen Enzyms. Die erhöhte Entgiftungskapazität gilt als ein schützender Effekt, der vermutlich posttranslational durch die kurzkettige Fettsäure hervorgerufen wurde.
- Butyrat führt in normalen Kolonzellen zu einer Steigerung der Expression der wichtigen Entgiftungsenzyme *GSTP1* und *GSTM2*, die unter den gegebenen Bedingungen jedoch mit einer signifikant verminderten GST-Gesamtaktivität einherging. Untersuchungen bzgl. der kinetischen Regulation und zu funktionellen Konsequenzen könnten zukünftig Aufschluss geben, welche Ursachen für die Diskrepanz verantwortlich sind und mögliche Folgen für den zellulären Schutz ermitteln.
- Die mRNA-Expression des alpha-Defensins *DEFA6* wird in gesunden Kolonepithelzellen in Gegenwart von Butyrat tendenziell nach oben reguliert. Die funktionellen Konsequenzen dieser Modulation sind noch unklar.
- Während Normal- und Tumorgewebe in Bezug auf die mRNA-Expression von *OPN*, *COX-2*, *PKM2* und *SOD2* eher ähnliche Reaktionen auf die Behandlung mit Butyrat zeigen, findet eine Induktion der *CAT* und des *HSP90 β* (mRNA) nur in normalen Kolonepithelzellen statt. Die Ergebnisse deuten auf eine differenzielle Regulation der Transkriptmengen einzelner Gene in Abhängigkeit des Transformationsgrades hin, während andere davon nicht beeinflusst werden.

- Butyrat vermindert unter den gegebenen Bedingungen zwar die mRNA-Expression von *PKM2* im malignen Kolongewebe, jedoch nicht die des korrespondierenden Proteins.
- Bei *HSP90β* wird weder die Gen- noch die Proteinexpression in Kolontumoren durch die C₄-Fettsäure beeinflusst, weshalb dieses Hitzeschockprotein offenbar nicht zu den Zielproteinen von Butyrat zu zählen ist.
- Der komplexe Fermentationsüberstand (FÜ) des Kohlenhydrates Synergy1[®], einer Mischung aus Inulin mit Oligofruktose, führt im humanen Tumor- und Normalgewebe des Kolons zu vergleichbaren Reaktionen wie Butyrat als Einzelsubstanz. Die Wirkung könnte dabei sowohl auf die im FÜ enthaltene Menge an Butyrat (3 mM) als auch auf das komplexe Zusammenwirken mehrerer Einzelsubstanzen (Synergismus) zurückzuführen sein. Die beobachteten Effekte des FÜ beschränken sich dabei vornehmlich auf die mRNA-Expression von *COX-2*, *PKM2*, *CAT* und *SOD2*, während Butyrat zudem Einfluss auf die Expression von *OPN* und *GSTs* nimmt.
- Das mRNA-Expressionsniveau eines spezifischen Gens ist im Allgemeinen kein verlässlicher Parameter, um Veränderungen des korrespondierenden Proteins oder seiner Aktivität vorherzusagen und damit als alleiniger Parameter ungeeignet. Die Bestimmung der mRNA-Expression liefert dennoch ergänzend zu den Proteindaten wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Transkriptionsregulation und ist deshalb ein unverzichtbarer Teil entsprechender Studien.
- Weiterführende Untersuchungen setzen eine Optimierung der Kulturbedingungen für primäre Kolonepithelzellen voraus. Um zukünftig mögliche Effekte von *in vitro* oder *in vivo* gewonnenen Darmfermentationsprodukten nach Langzeitinkubation zu ermitteln und damit die In-vivo-Situation besser abbilden zu können, ist eine Kultivierungsmethode erforderlich, die primären Kolonepithelzellen eine Lebensdauer von mehr als 12 h ermöglicht. Die Kultivierung sollte eine hohe Vitalität der Zellen und die Integrität von zellulären Makromolekülen gewährleisten sowie das Wachstum bzw. die Proliferation anregen. Aktuellen Ergebnissen der Arbeitsgruppe zufolge, können primäre Kolonzellen inzwischen als Kolonkrypten-Pellets für 24 h kultiviert werden ⁽³³¹⁾.
- Die vorliegenden Untersuchungen erweitern das Verständnis zu den protektiven Mechanismen von Ballaststoffen.

4.5 Ausblick

Die Untersuchungen an chirurgisch entferntem Kolongewebe haben in dieser Arbeit Einblicke in die Reaktion des humanen Dickdarmgewebes auf Darmfermentationsprodukte gegeben und hierbei wichtige Informationen in Ergänzung zu Studien mit Kolonkrebszelllinien oder Tiermodellen geliefert. Darüber hinaus manifestieren sie den Wert zahlreicher Untersuchungen zu Mechanismen der Butyrat-Wirkung an immortalisierten Kolonkrebszellen, der andernfalls unklar wäre. Zukünftige Studien sollten deshalb - auch aufgrund der Nähe zur In-vivo-Situation - bevorzugt auf humanes Kolongewebe zurückgreifen und ihren Schwerpunkt neben den Wirkungen von Ballaststoff-Fermentationsprodukten auf das humane Darmepithel ebenso auf prämaligne Vorstufen legen. Diese bleiben aufgrund ihrer Beschwerdefreiheit oftmals unentdeckt, erhöhen jedoch das Risiko für eine maligne Erkrankung des Kolorektums. Zudem sollten Gewebeproben von gesunden Spendern einbezogen werden, um eine wirkliche Vergleichskontrolle zu erhalten. Verschiedene Untersuchungen haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass das histologisch normal erscheinende Kolonepithel von Kolonkrebs- bzw. Risikopatienten bereits ein verändertes Genexpressionsmuster im Vergleich zu dem von völlig gesunden Probanden aufweist ⁽³³²⁻³³⁴⁾. Eine entsprechend hohe Anzahl an Spendern zur Minimierung individueller Einflüsse und Identifizierung signifikanter Effekte ist bei allen Versuchsserien eine unabdingbare Voraussetzung. Die damit in Aussicht stehende Sammlung individueller Spenderdaten, die beispielsweise Auskunft über den Ernährungsstatus oder die Einnahme von Medikamenten geben, könnte helfen, Reaktionen einzelner Gewebe von Probanden besser zu erklären. Weitere wichtige Ziele stellen die Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen von Butyrat und Darmfermentationsgemischen im Allgemeinen sowie die resultierenden funktionellen Konsequenzen dar.

Da die gegenwärtigen Untersuchungen an humanem Kolongewebe jedoch nur auf einem Modellsystem basieren, sind zukünftig Humanstudien erforderlich, um mehr über die Bedeutung derartiger Ergebnisse für die In-vivo-Situation zu erfahren. Eine Interventionsstudie zur Untersuchung ausgewählter Parameter der Krebs-Chemoprävention könnte hierbei neue Erkenntnisse liefern und dabei helfen, die zugrundeliegenden komplexen Wirkmechanismen von Ballaststoffen besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Maligne Erkrankungen des Dickdarms und des Rektums sind weltweit eine der am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen und krebsbedingten Todesursachen, insbesondere in Ländern mit westlicher Ernährungsweise. Schätzungen zufolge, könnten bis zu 70 % aller sporadisch auftretenden Kolontumore durch eine ausgewogene Ernährungs- und Lebensweise vermieden werden. Kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat, die aus dem bakteriellen Abbau von Ballaststoffen im Kolon hervorgehen, tragen aufgrund zahlreicher antikanzeregener Effekte möglicherweise entscheidend dazu bei, das Risiko für kolorektale Läsionen zu vermindern. Untersuchungen, die diese Einflüsse auf humane Kolonepithelzellen hinreichend belegen, fehlen bislang jedoch.

Zielstellung: Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auf die Untersuchung des Einflusses von Butyrat und einem *in vitro* fermentierten Inulin/Oligofruktose-Gemisch (Synergy1®) auf ausgewählte Gene und partiell deren Proteine in verschiedenen transformierten Kolongeweben gelegt. Die analysierten Gene werden mit diversen zellulären Prozessen, wie der Stressabwehr (*SOD2*, *CAT*, *HSP90B*), Glykolyse (*PKM2*), Immunabwehr (*DEFA1-3*, *DEFA6*), Entgiftung (*GSTP1*, *GSTM2*) sowie Entzündung (*COX-2*) und Zelladhäsion (*OPN*) assoziiert und besitzen aufgrund ihrer Funktion Bedeutung für die Chemoprävention und Progression des kolorektalen Karzinoms. Ein weiteres Ziel bestand darin, die basalen Expressionslevel (unter Berücksichtigung klinischer Parameter) zu erfassen.

Methoden: Für die Untersuchungen wurden gepaarte Normal-, Adenom- und/oder Tumorgewebeproben des Kolons von insgesamt 51 Spendern mit einem diagnostizierten Kolorektalkarzinom oder einer Polypose verwendet. Die Ermittlung des mRNA-Expressionsniveaus vor (basal) und nach Applikation der Testsubstanzen (10 mM Butyrat, 10 % In-vitro-Fermentationsüberstand von Synergy1®; 12 h) erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR; korrespondierende Proteinmengen wurden hingegen mittels Western Blot oder enzymgekoppelten Immunadsorptionstests nachgewiesen. Veränderungen der katalytischen Aktivität spezifischer Enzyme (*SOD2*, *CAT*, Gesamt-GSTs) wurden spektralphotometrisch erfasst. Die Beurteilung funktioneller Konsequenzen im Hinblick auf eine verbesserte Stressabwehr erfolgte über eine Bestimmung H₂O₂-induzierter DNA-Schäden unter Zuhilfenahme des Comet Assays.

Ergebnisse: Mit Ausnahme von *CAT* und *GSTM2* wurden alle untersuchten Gene überexprimiert in Kolontumoren und partiell auch in Adenomen gefunden. Bemerkenswert ist hierbei der 100-fache (Median) Anstieg der mRNA-Expression des *DEFA6*-Gens in den prä-malignen Kolongeweben. Ein Zusammenhang zwischen der Expression und klinischen Parametern konnte nur für *PKM2* (Tumorgrading) nachgewiesen werden. Die erhöhte

Expression von PKM2 sowie SOD2 in Tumoren war darüber hinaus auch auf Proteinebene der Enzyme feststellbar. Mit Hilfe von Korrelationsanalysen wurde ferner ein altersbedingter Abfall der Aktivität antioxidativer Enzymsysteme (CAT, SOD2) in der normalen Kolonmukosa identifiziert. Die Exposition des Gewebes mit Butyrat bewirkte hingegen eine signifikante Induktion von CAT (Gen/Protein) und SOD2 (Aktivität), die vermutlich durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst wird. Trotz des Anstiegs konnte bisher kein verbesserter Schutz des Gewebes vor oxidativem Stress nachgewiesen werden. Im Tumor- und tendenziell auch im Normalgewebe führte Butyrat des Weiteren zu einer Reduktion der Transkriptmengen von *OPN*, *COX-2* und *PKM2*, die sich auf Proteinebene nur marginal widerspiegelte. Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass Tumore mit einer geringeren *OPN*-Basalexpression empfindlicher auf Butyrat reagierten als solche mit einer hohen *OPN*-Transkriptmenge; der umgekehrte Fall scheint für *COX-2* im Normalgewebe zu gelten. Divergierende Ergebnisse auf mRNA- und Proteinebene wurden darüber hinaus ebenso für GSTs festgestellt. Das *in vitro* fermentierte Synergy1® erzielte im Vergleich zu Butyrat ähnliche Effekte im Hinblick auf die Regulation von *PKM2*, *COX-2*, *CAT* und *SOD2* im Normal- und Tumorgewebe. Dabei ist eine synergistische Wirkung mehrerer Komponenten aufgrund der geringeren Butyrat-Konzentration des verwendeten Fermentationsüberstandes (3 mM) wahrscheinlich. Korrelationsanalysen identifizierten lediglich für die basale SOD2-Expression (Tumor) sowie für HSP90β (im Tumor nach Butyrat-Inkubation) einen signifikanten Zusammenhang zwischen Transkript- und Proteinmenge. Für die übrigen Gene konnte nur bei 30-77 % der analysierten Spender eine gleichgerichtete Änderung der individuellen Gen- und Proteinexpressionwerte festgestellt werden.

Schlussfolgerungen: *DEFA6* könnte als ein neuer Marker für prämaligne Tumorstadien dabei helfen, die Diagnosemöglichkeiten für Kolorektalkrebs zu verbessern. Fermentationsprodukte wie Butyrat oder jene, die im Fermentationsüberstand von Synergy1® enthalten sind, zeigen anhand der Modulation einer Auswahl an Genen in humanem Kolongewebe potenziell chemopräventive Aktivitäten. Konsequenzen für die Expression der korrespondierenden Proteine und deren Aktivität sollten allerdings in zukünftigen Studien noch eingehender erforscht werden. Die vorliegenden Untersuchungen tragen dazu bei, das Verständnis der protektiven Wirkungen von Ballaststoffen zu erweitern.

6 Abstract

Introduction: Colorectal cancer is one of the most common malignant diseases and causes of cancer death worldwide, especially in countries with a Western style diet. About 70 % of sporadic cancer cases are linked to diet, thereby providing potent opportunities for its prevention. The consumption of dietary fiber experienced constant interest in this regard for several decades and is associated with a risk lowering effect. Short chain fatty acids like butyrate, which result from the colonic fermentation of dietary fiber, are assumed to contribute to this protective action due to several anti-cancer properties that were mainly shown using cancer cell lines and partially animal models. However, studies demonstrating similar protective effects in primary human colon epithelial cells are limited.

Objective: The present work aimed at investigating the impact of butyrate and an *in vitro* fermented mixture of inulin and oligofructose (Synergy1®) on selected genes and their corresponding proteins in human colon tissues of different transformation stages. In line with this, basal expression levels were determined in consideration of clinical parameters. A secondary aim was to assess whether some of these results are linked to functional consequences by measuring enzyme activities (CAT, SOD2, and total GSTs) and the H₂O₂-induced genotoxicity. Genes included are involved in various cellular processes, such as stress response (*SOD2*, *CAT*, *HSP90B*), inflammation (*COX-2*), detoxification (*GSTP1*, *GSTM2*), glycolysis (*PKM2*), cell adhesion (*OPN*), and immune response (*DEFA1-3*, *DEFA6*).

Methods: Paired normal, adenoma, and/or tumor colon tissues derived from 51 patients with colorectal cancer or polyposis were used for the various experiments. Gene expression was analyzed in tissues before (basal) and after test substances (10 mM butyrate, 10 % fermentation supernatant of *in vitro* fermented Synergy 1®; 12 h) were applied. Protein levels were determined by Western blot or enzyme immunoassays. Activities of CAT, SOD2 and total GSTs were measured using spectrophotometric assays. For determination of DNA damage, the Comet assay was performed.

Results: Excepting *CAT* and *GSTM2*, the genes selected were overexpressed in colon tumors and partially also in adenomas. Remarkably, an extreme high increase in *DEFA6* mRNA expression (100-fold) was found in adenoma tissue when compared to normal counterparts. No correlation between gene expression and stage or grading of tumors was observed, with exception of *PKM2* (grading). Analyses of the corresponding protein level revealed similar expression patterns for *PKM2* and *SOD2* in colon tumors. Furthermore, an age-dependent decrease in the activity of antioxidant enzymes (*CAT*, *SOD2*) in normal colon epithelium was noted. Butyrate increased significantly the expression and/or activity of these proteins in normal tissue, whereas detoxifying enzymes

like *GSTP1* and *GSTM2* were only found elevated at transcript level so far. In tumors as well as in normal tissue, mRNA expression of *OPN*, *COX-2*, and *PKM2* was significantly decreased by butyrate with only minor changes at protein level. Tumors with lower levels of *OPN* transcripts seemed to be more sensitive to inhibition by butyrate than those with higher levels. A reverse effect is assumed for *COX-2* in normal tissue. The *in vitro* fermented Synergy1[®], that better depicts the *in vivo* situation, induced similar changes in *PKM2*, *COX-2*, *CAT*, and *SOD2* mRNA expression when compared to butyrate. The interaction of several metabolites might be responsible for these effects.

Using correlation analyses, significant relationships were identified between the expression ratios of *SOD2* mRNA and protein in colon tumors as well as between *HSP90 β* mRNA and protein in colon tumor tissue after butyrate application. For the other genes, only 30-77 % of the donors showed similar gene and protein expression ratios.

Conclusions: As a novel marker for premalignant tumor stages, *DEFA6* could improve the diagnostic tools for colorectal cancer. Fermentation products like butyrate or those contained in the supernatant of *in vitro* fermented Synergy1[®] showed potential chemopreventive activities in human colon tissue by modulating the expression of a selected set of genes. Data on protein expression and functional consequences, however, are still inconclusive and need to be the subject of further investigations. Nevertheless, the present study enhances our understanding of how dietary fiber contributes to the protection against colorectal cancer.

7 Literaturverzeichnis

1. Gemeinsamer Bundesausschuss. Richtlinie über die Früherkennung von Krebserkrankungen. Fassung vom 18.06.2009, Letzte Änderung am 16.12.2012, In Kraft getreten am 03.03.2011. *Bundesanzeiger* **2011**;34:864
2. World Cancer Research Fund/American Institute of Cancer Research. Systematic literature review. Continuous update project report. The associations between food, nutrition, physical activity and the risk of colorectal cancer. www.dietandcancerreport.org/index.php **2011**.
3. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Vollwertig essen und trinken nach den 10 Regeln der DGE. www.dge.de. **2011**.
4. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *Washington DC* **2007**.
5. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, and Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol* **2011**;17(12):1519-1528.
6. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, and Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**;27(2):104-119.
7. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, and Parkin D. Globocan 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. **2010**;Datum des letzten Zugriffs: 27.06.11.
8. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e V (Hrsg) Berlin **2012**.
9. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, and Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **2010**;138(6):2044-2058.
10. Patel BB, Yu Y, Du J, Levi E, Phillip PA, and Majumdar AP. Age-related increase in colorectal cancer stem cells in macroscopically normal mucosa of patients with adenomas: a risk factor for colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**;378(3):344-347.
11. Kolligs FT, Crispin A, Munte A, Wagner A, Mansmann U, and Goke B. Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender. *PLoS One* **2011**;6(5):e20076.
12. Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis* **2010**;28(4-5):619-624.
13. Bingham SA, Day NE, Luben R et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **2003**;361(9368):1496-1501.
14. Bingham SA, Norat T, Moskal A et al. Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2005**;14(6):1552-1556.
15. Dahm CC, Keogh RH, Spencer EA et al. Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries. *J Natl Cancer Inst* **2010**;102(9):614-626.
16. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D et al. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* **2005**;294(22):2849-2857.

17. Michels KB, Fuchs CS, Giovannucci E, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, and Willett WC. Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2005**;14(4):842-849.
18. Neri E, Faggioni L, Cini L, and Bartolozzi C. Colonic polyps: inheritance, susceptibility, risk evaluation, and diagnostic management. *Cancer Manag Res* **2010**;317-24.
19. Lanza E, Yu B, Murphy G et al. The polyp prevention trial continued follow-up study: no effect of a low-fat, high-fiber, high-fruit, and -vegetable diet on adenoma recurrence eight years after randomization. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**;16(9):1745-1752.
20. Sansbury LB, Wanke K, Albert PS, Kahle L, Schatzkin A, and Lanza E. The effect of strict adherence to a high-fiber, high-fruit and -vegetable, and low-fat eating pattern on adenoma recurrence. *Am J Epidemiol* **2009**;170(5):576-584.
21. Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**;61(5):759-767.
22. Wood LD, Parsons DW, Jones S et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **2007**;318(5853):1108-1113.
23. Arends JW. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* **2000**;190(4):412-416.
24. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* **1984**;44(10):4217-4223.
25. Vincent TL and Gatenby RA. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol* **2008**;32(4):729-737.
26. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**;144(5):646-674.
27. Ponz de LM and Di GC. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* **2001**;33(4):372-388.
28. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **2011**;6479-507.
29. Fodde R, Smits R, and Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **2001**;1(1):55-67.
30. Sieber OM, Tomlinson IP, and Lamlum H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor--genetics, function and disease. *Mol Med Today* **2000**;6(12):462-469.
31. Andreu P, Colnot S, Godard C et al. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* **2005**;132(6):1443-1451.
32. Vogelstein B and Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **2004**;10(8):789-799.
33. Nandan MO and Yang VW. An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* **2011**;7(2):113-120.
34. Roberts PJ and Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **2007**;26(22):3291-3310.
35. Luo F, Pouligiannis G, Ye H, Hamoudi R, Zhang W, Dong G, and Arends MJ. Mutant K-ras promotes carcinogen-induced murine colorectal tumorigenesis, but does not alter tumour chromosome stability. *J Pathol* **2011**;223(3):390-399.

36. Bernet A and Fitamant J. Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion. *Expert Opin Ther Targets* **2008**;12(8):995-1007.
37. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **2004**;4(12):978-987.
38. Castets M, Broutier L, Molin Y et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* **2011**;482(7386):534-537.
39. Mehlen P and Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* **2004**;22(16):3420-3428.
40. Derks S, Bosch LJ, Niessen HE et al. Promoter CpG island hypermethylation- and H3K9me3 and H3K27me3-mediated epigenetic silencing targets the deleted in colon cancer (DCC) gene in colorectal carcinogenesis without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21. *Carcinogenesis* **2009**;30(6):1041-1048.
41. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, and Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **1990**;50(23):7717-7722.
42. Harris SL and Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **2005**;24(17):2899-2908.
43. Niida H and Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **2006**;21(1):3-9.
44. Suzuki K and Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* **2011**;2011:978312.
45. Xie J and Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2008**;14(3):378-389.
46. Moran A, Ortega P, de JC et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* **2010**;2(3):151-158.
47. Heinimann K. Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektalkarzinom ohne generalisierte Polypose). *Schweizerische Ärztezeitung* **2000**;81(36):2009-2012.
48. Vilar E and Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* **2010**;7(3):153-162.
49. Dietmaier W. [Microsatellite instability. A new predictive marker (?)]. *Pathologe* **2010**;31 Suppl 2:268-273.
50. Baretton GB. [Serrated pathway of colorectal carcinogenesis]. *Pathologe* **2010**;31(1):9-15.
51. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, and Hughes J. Osteopontin—a molecule for all seasons. *QJM* **2002**;95(1):3-13.
52. O'Regan A and Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* **2000**;81(6):373-390.
53. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, and Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* **2002**;94(7):513-521.
54. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, and Yeatman TJ. Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C R Biol* **2003**;326(10-11):1041-1043.

55. Boldrini L, Donati V, Dell'Omodarme M et al. Prognostic significance of osteopontin expression in early-stage non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **2005**;93(4):453-457.
56. Donati V, Boldrini L, Dell'Omodarme M et al. Osteopontin expression and prognostic significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **2005**;11(18):6459-6465.
57. Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, Rosenberg R, Marthen C, Doll D, Holzmann B, Siewert JR, and Janssen KP. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer* **2007**;121(8):1717-1723.
58. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, and Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res* **2001**;7(12):4060-4066.
59. Wai PY, Mi Z, Guo H, Sarraf-Yazdi S, Gao C, Wei J, Marroquin CE, Clary B, and Kuo PC. Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis* **2005**;26(4):741-751.
60. McAllister SS, Gifford AM, Greiner AL et al. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* **2008**;133(6):994-1005.
61. Wai PY, Guo L, Gao C, Mi Z, Guo H, and Kuo PC. Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery* **2006**;140(2):132-140.
62. Courter D, Cao H, Kwok S et al. The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways. *PLoS One* **2010**;5(3):e9633.
63. Martinez C, Churchman M, Freeman T, and Ilyas M. Osteopontin provides early proliferative drive and may be dependent upon aberrant c-myc signalling in murine intestinal tumours. *Exp Mol Pathol* **2010**;88(2):272-277.
64. Morimoto I, Sasaki Y, Ishida S, Imai K, and Tokino T. Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes Cancer* **2002**;33(3):270-278.
65. Wai PY and Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **2008**;27(1):103-118.
66. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, Petersen TE, and Sorensen ES. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J* **2005**;390(Pt 1):285-292.
67. Christensen B, Kazanecki CC, Petersen TE, Rittling SR, Denhardt DT, and Sorensen ES. Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem* **2007**;282(27):19463-19472.
68. Vane JR, Bakhle YS, and Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1998**;38:97-120.
69. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **2001**;294(5548):1871-1875.
70. Rouzer CA and Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* **2009**;50 Suppl:S29-S34.
71. Smith WL and Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* **2001**;107(12):1491-1495.

72. Bernardini N, Colucci R, Mattii L et al. Constitutive expression of cyclooxygenase-2 in the neuromuscular compartment of normal human colon. *Neurogastroenterol Motil* **2006**;18(8):654-662.
73. Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, and Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med* **2009**;13(9B):3753-3763.
74. Kis B, Snipes JA, and Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**;315(1):1-7.
75. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, and Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* **1995**;55(12):2556-2559.
76. Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, and Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **2004**;10(24):8465-8471.
77. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, and Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **1996**;87(5):803-809.
78. McLean MH, Murray GI, Fyfe N, Hold GL, Mowat NA, and El-Omar EM. COX-2 expression in sporadic colorectal adenomatous polyps is linked to adenoma characteristics. *Histopathology* **2008**;52(7):806-815.
79. Pugh S and Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* **1994**;35(5):675-678.
80. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, and Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* **2009**;30(3):377-386.
81. Wang L, Chen W, Xie X, He Y, and Bai X. Celecoxib inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic implantation tumor model of human colon cancer. *Exp Oncol* **2008**;30(1):42-51.
82. Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, and Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* **2003**;63(3):586-592.
83. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, and Harris CC. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res* **2003**;63(3):728-734.
84. Dixon DA. Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog Exp Tumor Res* **2003**;37:52-71.
85. Hsi LC, ngerman-Stewart J, and Eling TE. Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. *Carcinogenesis* **1999**;20(11):2045-2049.
86. Binion DG, Otterson MF, and Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* **2008**;57(11):1509-1517.
87. Zhang Z, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD, and DuBois RN. Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 in rat intestinal epithelial cells. *Neoplasia* **2000**;2(6):523-530.

88. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, and Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* **2005**;15(4):300-308.
89. Yamada K and Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* **1999**;337(Pt 1):1-11.
90. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, and Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **2008**;452(7184):230-233.
91. Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, and Ganapathy V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J* **2009**;417(1):379-389.
92. Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG et al. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal* **2009**;2(97):ra73.
93. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**;123(3191):309-314.
94. Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E, and Jansen-Durr P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96(4):1291-1296.
95. Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, and Eigenbrodt E. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* **2001**;20(47):6891-6898.
96. Altenberg B and Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* **2004**;84(6):1014-1020.
97. Koss K, Maxton D, and Jankowski JA. Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention. *Colorectal Dis* **2008**;10(3):244-248.
98. Mogk A, Mayer M.P., and Deuerling E. Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential: Mechanismen der Proteinfaltung. *Biologie in unserer Zeit* **2001**;31(3):182-192.
99. Pearl LH, Prodromou C, and Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* **2008**;410(3):439-453.
100. Brown MA, Zhu L, Schmidt C, and Tucker PW. Hsp90--from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**;363(2):241-246.
101. Zuehlke A and Johnson JL. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* **2010**;93(3):211-217.
102. Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, and Buchner J. The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* **2006**;25(2):367-376.
103. Bali P, Pranpat M, Bradner J et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* **2005**;280(29):26729-26734.
104. Kekatpure VD, Dannenberg AJ, and Subbaramaiah K. HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Biol Chem* **2009**;284(12):7436-7445.
105. Jakob U, Lilie H, Meyer I, and Buchner J. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem* **1995**;270(13):7288-7294.

106. Becker B, Multhoff G, Farkas B, Wild PJ, Landthaler M, Stolz W, and Vogt T. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp Dermatol* **2004**;13(1):27-32.
107. Diehl MC, Idowu MO, Kimmelshue K, York TP, Elmore LW, and Holt SE. Elevated expression of nuclear Hsp90 in invasive breast tumors. *Cancer Biol Ther* **2009**;8(20):1952-1961.
108. Elmore LW, Forsythe R, Forsythe H, Bright AT, Nasim S, Endo K, and Holt SE. Overexpression of telomerase-associated chaperone proteins in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinomas. *Oncol Rep* **2008**;20(3):613-617.
109. Milicevic Z, Bogojevic D, Mihailovic M, Petrovic M, and Krivokapic Z. Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cancer cells and its association with tumour progression. *Int J Oncol* **2008**;32(6):1169-1178.
110. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, and Clarke PA. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res* **2001**;61(10):4003-4009.
111. Moser C, Lang SA, Kainz S, Gaumann A, Fichtner-Feigl S, Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK, and Stoeltzing O. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* **2007**;6(11):2868-2878.
112. Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, and Neckers L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* **2010**;10(8):537-549.
113. Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, and Schwartz SA. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate* **2008**;68(16):1773-1789.
114. Basak S, Pookot D, Noonan EJ, and Dahiya R. Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Mol Cancer Ther* **2008**;7(10):3195-3202.
115. Tran PL, Kim SA, Choi HS, Yoon JH, and Ahn SG. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer* **2010**;10:276.
116. Cunliffe RN and Mahida YR. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* **2004**;75(1):49-58.
117. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, and Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* **2002**;23(6):291-296.
118. Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, and Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* **2005**;5:8.
119. Melle C, Ernst G, Schimmel B et al. Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology* **2005**;129(1):66-73.
120. Holterman DA, Diaz JI, Blackmore PF, Davis JW, Schellhammer PF, Corica A, Semmes OJ, and Vlahou A. Overexpression of alpha-defensin is associated with bladder cancer invasiveness. *Urol Oncol* **2006**;24(2):97-108.

121. Muller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T et al. Human alpha-defensins HNP-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation. *Am J Pathol* **2002**;160(4):1311-1324.
122. Zhang K, Lu Q, Zhang Q, and Hu X. Regulation of activities of NK cells and CD4 expression in T cells by human HNP-1, -2, and -3. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**;323(2):437-444.
123. Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, and Lehrer RI. In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* **1986**;68(6):1407-1410.
124. Aarbiou J, Tjabringa GS, Verhoosel RM, Ninaber DK, White SR, Peltenburg LT, Rabe KF, and Hiemstra PS. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. *Inflamm Res* **2006**;55(3):119-127.
125. Zou H, Harrington JJ, Sugumar A, Klatt KK, Smyrk TC, and Ahlquist DA. Detection of colorectal disease by stool defensin assay: an exploratory study. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2007**;5(7):865-868.
126. Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, and Bodelsson M. Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis. *J Innate Immun* **2010**;2(5):478-482.
127. Cunliffe RN, Kamal M, Rose FR, James PD, and Mahida YR. Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *J Clin Pathol* **2002**;55(4):298-304.
128. Nam MJ, Kee MK, Kuick R, and Hanash SM. Identification of defensin alpha6 as a potential biomarker in colon adenocarcinoma. *J Biol Chem* **2005**;280(9):8260-8265.
129. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102(50):18129-18134.
130. Wehkamp J, Wang G, Kubler I et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* **2007**;179(5):3109-3118.
131. Pinto D and Clevers H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* **2005**;97(3):185-196.
132. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**;39(1):44-84.
133. Mates JM and Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* **1999**;4:D339-D345.
134. Miao L and St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* **2009**;47(4):344-356.
135. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S, and Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**;93(18):9782-9787.
136. Van RH, Ikeno Y, Hamilton M et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* **2003**;16(1):29-37.
137. Cullen JJ, Mitros FA, and Oberley LW. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* **2003**;26(1):23-27.

138. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, and Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* **2000**;60(14):3927-3939.
139. Ough M, Lewis A, Zhang Y, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Oberley LW, and Cullen JJ. Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma. *Free Radic Res* **2004**;38(11):1223-1233.
140. Kinnula VL and Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* **2004**;36(6):718-744.
141. Connor KM, Hempel N, Nelson KK, Dabiri G, Gamarra A, Belarmino J, Van de WL, Mian BM, and Melendez JA. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res* **2007**;67(21):10260-10267.
142. Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, Rodriguez AM, Providence KM, Rutter JL, Pumiglia K, Bennett JA, and Melendez JA. Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin Cancer Res* **2003**;9(1):424-432.
143. Oberley TD and Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* **1997**;12(2):525-535.
144. Wang Z, Yang H, Ramesh A, Roberts LJ, Zhou L, Lin X, Zhao Y, and Guo Z. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **2009**;47(8):1221-1229.
145. Sengottuvelan M, Senthilkumar R, and Nalini N. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **2006**;1760(8):1175-1183.
146. Srihari T, Sengottuvelan M, and Nalini N. Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *J Pharm Pharmacol* **2008**;60(6):787-794.
147. de Moreno de LA, LeBlanc JG, Perdigon G, Miyoshi A, Langella P, Azevedo V, and Sesma F. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J Med Microbiol* **2008**;57(Pt 1):100-105.
148. Nishikawa M, Tamada A, Kumai H, Yamashita F, and Hashida M. Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. *Int J Cancer* **2002**;99(3):474-479.
149. Maffei F, Angeloni C, Malaguti M et al. Plasma antioxidant enzymes and clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk. *Mutat Res* **2011**;714(1-2):88-92.
150. Ozturk HS, Karaayvaz M, Kacmaz M, Kavutcu M, Akgul H, and Durak I. Activities of the enzymes participating in purine and free-radical metabolism in cancerous human colorectal tissues. *Cancer Biochem Biophys* **1998**;16(1-2):157-168.
151. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, and Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **2005**;11(3):403-406.
152. Yang J, Lam EW, Hammad HM, Oberley TD, and Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and normal human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* **2002**;31(2):71-77.

153. Eaton DL and Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* **1999**;49(2):156-164.
154. Hayes JD, Flanagan JU, and Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2005**;45:51-88.
155. Hinchman CA, Rebbeor JF, and Ballatori N. Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am J Physiol* **1998**;275(4 Pt 1):G612-G619.
156. Pombrio JM, Giangreco A, Li L, Wempe MF, Anders MW, Sweet DH, Pritchard JB, and Ballatori N. Mercapturic acids (N-acetylcysteine S-conjugates) as endogenous substrates for the renal organic anion transporter-1. *Mol Pharmacol* **2001**;60(5):1091-1099.
157. Ebert MN, Klinder A, Peters WH, Schaferhenrich A, Sendt W, Scheele J, and Pool-Zobel BL. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis* **2003**;24(10):1637-1644.
158. Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, and Sonawane B. Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **2009**;12(5-6):389-439.
159. Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* **1999**;443(1-2):139-147.
160. Nomani H, Ghobadloo SM, Yaghmaei B, Rezvanie NA, and Yaghmaei K. Glutathione S-transferases activity in patients with colorectal cancer. *Clin Biochem* **2005**;38(7):621-624.
161. Miyanishi K, Takayama T, Ohi M et al. Glutathione S-transferase-pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology* **2001**;121(4):865-874.
162. Nobuoka A, Takayama T, Miyanishi K et al. Glutathione-S-transferase P1-1 protects aberrant crypt foci from apoptosis induced by deoxycholic acid. *Gastroenterology* **2004**;127(2):428-443.
163. Kamada K, Goto S, Okunaga T et al. Nuclear glutathione S-transferase pi prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA products. *Free Radic Biol Med* **2004**;37(11):1875-1884.
164. Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, and Ronai Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res* **2000**;60(15):4053-4057.
165. Ban N, Takahashi Y, Takayama T, Kura T, Katahira T, Sakamaki S, and Niitsu Y. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res* **1996**;56(15):3577-3582.
166. Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, and Mannervik B. Glutathione transferases catalyze the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J* **1997**;324(Pt 1):25-28.
167. Cavalieri EL, Li KM, Balu N, Saeed M, Devanesan P, Higginbotham S, Zhao J, Gross ML, and Rogan EG. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis* **2002**;23(6):1071-1077.
168. Strobel G. Wechselwirkungen zwischen Katecholaminen, β -Adrenozeptoren, akuter körperlicher Belastung und Training. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **2002**;53(4):102-106.

169. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, and Wolf S. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* **2005**;26(6):1064-1076.
170. Ranganathan S and Tew KD. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases alpha, mu, and pi in normal tissue and carcinomas from human colon. *Carcinogenesis* **1991**;12(12):2383-2387.
171. Peng DF, Razvi M, Chen H, Washington K, Roessner A, Schneider-Stock R, and El-Rifai W. DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* **2009**;58(1):5-15.
172. Tang SC, Sheu GT, Wong RH, Huang CY, Weng MW, Lee LW, Hsu CP, and Ko JL. Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene. *Toxicol Lett* **2010**;192(3):316-323.
173. Half E and Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother* **2009**;10(2):211-219.
174. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gesundheitsverhalten und -gefährdungen. <http://www.gbe-bund.de> **2008**; Datum des letzten Zugriffs: 01.11.2011.
175. Hong WK and Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **1997**;278(5340):1073-1077.
176. Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Prev Med* **1996**;25(1):44-45.
177. De FS and Ferguson LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* **2005**;591(1-2):8-15.
178. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **2000**;342(26):1946-1952.
179. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG et al. Five-year efficacy and safety analysis of the Adenoma Prevention with Celecoxib Trial. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **2009**;2(4):310-321.
180. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, and Gleis M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* **2009**;682(1):39-53.
181. Burkitt DP. Possible relationships between bowel cancer and dietary habits. *Proc R Soc Med* **1971**;64(9):964-965.
182. Burkitt DP, Walker AR, and Painter NS. Effect of dietary fibre on stools and the transit-times, and its role in the causation of disease. *Lancet* **1972**;2(7792):1408-1412.
183. DeVries JW. On defining dietary fibre. *Proc Nutr Soc* **2003**;62(1):37-43.
184. Cummings JH, Mann JI, Nishida C, and Vorster HH. Dietary fibre: an agreed definition. *Lancet* **2009**;373(9661):365-366.
185. Lattimer JM and Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* **2010**;2(12):1266-1289.
186. Roberfroid M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1993**;33(2):103-148.

187. Topping DL and Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **2001**;81(3):1031-1064.
188. Wong JM, de SR, Kendall CW, Emam A, and Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **2006**;40(3):235-243.
189. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, and Flint HJ. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **2000**;66(4):1654-1661.
190. Louis P, Young P, Holtrop G, and Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol* **2010**;12(2):304-314.
191. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, and Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* **2002**;217(2):133-139.
192. Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, and Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* **2004**;186(7):2099-2106.
193. Bernstein C, Holubec H, Bhattacharyya AK, Nguyen H, Payne CM, Zaitlin B, and Bernstein H. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol* **2011**;85(8):863-871.
194. Singh B, Halestrap AP, and Paraskeva C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* **1997**;18(6):1265-1270.
195. Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberge F, Scheppach W, and Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **2002**;37(4):458-466.
196. Usami M, Kishimoto K, Ohata A, Miyoshi M, Aoyama M, Fueda Y, and Kotani J. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr Res* **2008**;28(5):321-328.
197. Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, and Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* **1995**;36(1):93-99.
198. Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* **2007**;137(11 Suppl):2493S-2502S.
199. Gibson GR and Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **1995**;125(6):1401-1412.
200. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, and Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* **2004**;17(2):259-275.
201. Ito H, Takemura N, Sonoyama K, Kawagishi H, Topping DL, Conlon MA, and Morita T. Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin A secretion in the rat cecum. *J Agric Food Chem* **2011**;59(10):5771-5778.
202. Meyer D and Stasse-Wolthuis M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr* **2009**;63(11):1277-1289.

203. Roland N, Nugon-Baudon L, Andrieux C, and Szylit O. Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. *Br J Nutr* **1995**;74(2):239-249.
204. Abrams SA, Griffin IJ, and Hawthorne KM. Young adolescents who respond to an inulin-type fructan substantially increase total absorbed calcium and daily calcium accretion to the skeleton. *J Nutr* **2007**;137(11 Suppl):2524S-2526S.
205. Femia AP, Luceri C, Dolara P et al. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **2002**;23(11):1953-1960.
206. Hughes R and Rowland IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* **2001**;22(1):43-47.
207. Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, and Menanteau J. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* **2001**;48(1):53-61.
208. Klinder A, Forster A, Caderni G, Femia AP, and Pool-Zobel BL. Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer* **2004**;49(2):144-155.
209. Munjal U, Gleis M, Pool-Zobel BL, and Scharlau D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br J Nutr* **2009**;102(5):663-671.
210. Sauer J, Richter KK, and Pool-Zobel BL. Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *Br J Nutr* **2007**;97(5):928-937.
211. Limburg PJ, Mahoney MR, Ziegler KL et al. Randomized phase II trial of sulindac, atorvastatin, and prebiotic dietary fiber for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**;4(2):259-269.
212. Rafter J, Bennett M, Caderni G et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* **2007**;85(2):488-496.
213. Buecher B, Thouminot C, Menanteau J, Bonnet C, Jarry A, Heymann MF, Cherbut C, Galmiche JP, and Blottiere HM. Fructooligosaccharide associated with celecoxib reduces the number of aberrant crypt foci in the colon of rats. *Reprod Nutr Dev* **2003**;43(4):347-356.
214. Stein K, Borowicki A, Scharlau D et al. Modification of an in vitro model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention. *Br J Nutr* **2011**;105(5):678-687.
215. Lux S, Scharlau D, Schlormann W, Birringer M, and Gleis M. In vitro fermented nuts exhibit chemopreventive effects in HT29 colon cancer cells. *Br J Nutr* **2011**;1-10.
216. Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* **1985**;45(1):1-8.
217. Habig WH, Pabst MJ, and Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **1974**;249(22):7130-7139.
218. Kuebler I, Stange EF, Fellermann K, and Wehkamp J. Defensine: körpereigene Antibiotika als zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems [Defensins: endogenous antibiotics as a central part of innate immunity]. *Dtsch Med Wochenschr* **2006**;131(36):1960-1964.

219. Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* **2012**;586(5):585-595.
220. Bianchini M, Levy E, Zucchini C, Pinski V, Macagno C, De SP, Valvassori L, Carinci P, and Mordoh J. Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol* **2006**;29(1):83-94.
221. Shonk CE, Arison RN, Koven BJ, Majima H, and Boxer GE. Enzyme patterns in human tissues. 3. Glycolytic Enzymes in normal and malignant tissues of the colon and rectum. *Cancer Res* **1965**;25:206-213.
222. Radeva M. Expression analysis of a selected gene set in malignant and non-malignant tissues derived from individuals with colon cancer. Comparison with protein expression data. *Dissertation* **2009**.
223. Albrethsen J, Moller CH, Olsen J, Raskov H, and Gammeltoft S. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* **2006**;42(17):3057-3064.
224. Mothes H, Melle C, Ernst G, Kaufmann R, von EF, and Settmacher U. Human Neutrophil Peptides 1-3--early markers in development of colorectal adenomas and carcinomas. *Dis Markers* **2008**;25(2):123-129.
225. Janssen AM, Bosman CB, Sier CF, Griffioen G, Kubben FJ, Lamers CB, van Krieken JH, van d, V, and Verspaget HW. Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* **1998**;78(8):1051-1057.
226. Janssen AM, Bosman CB, Kruidenier L, Griffioen G, Lamers CB, van Krieken JH, van d, V, and Verspaget HW. Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J Cancer Res Clin Oncol* **1999**;125(6):327-335.
227. Beno I, Staruchova M, Volkovova K, and Batovsky M. Increased antioxidant enzyme activities in the colorectal adenoma and carcinoma. *Neoplasma* **1995**;42(5):265-269.
228. Hengstler JG, Bottger T, Tanner B, Dietrich B, Henrich M, Knapstein PG, Junginger T, and Oesch F. Resistance factors in colon cancer tissue and the adjacent normal colon tissue: glutathione S-transferases alpha and pi, glutathione and aldehyde dehydrogenase. *Cancer Lett* **1998**;128(1):105-112.
229. Lauer C, Volkl A, Riedl S, Fahimi HD, and Beier K. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Carcinogenesis* **1999**;20(6):985-989.
230. Chen G, Gharib TG, Huang CC et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* **2002**;1(4):304-313.
231. Guo Y, Xiao P, Lei S et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2008**;40(5):426-436.
232. Pagnini C, Corleto VD, Mangoni ML, Piloizzi E, Torre MS, Marchese R, Carnuccio A, Giulio ED, and Delle FG. Alteration of local microflora and alpha-defensins hyper-production in colonic adenoma mucosa. *J Clin Gastroenterol* **2011**;45(7):602-610.
233. Albuquerque C, Baltazar C, Filipe B et al. Colorectal cancers show distinct mutation spectra in members of the canonical WNT signaling pathway according to their anatomical location and type of genetic instability. *Genes Chromosomes Cancer* **2010**;49(8):746-759.
234. Tonus C, Neupert G, and Sellinger M. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World J Gastroenterol* **2006**;12(43):7007-7011.

235. Cable S, Keller JM, Colin S, Haffen K, Kedinger M, Parache RM, and Dauca M. Peroxisomes in human colon carcinomas. A cytochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **1992**;62(4):221-226.
236. Alexandrova ML and Bochev PG. Reduced extracellular phagocyte oxidative activity, antioxidant level changes and increased oxidative damage in healthy human blood as a function of age. *Age (Dordr)* **2009**;31(2):99-107.
237. Fujimoto H, Kobayashi H, and Ohno M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Circ J* **2010**;74(2):353-360.
238. Kasapoglu M and Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* **2001**;36(2):209-220.
239. Kasapovic J, Pejic S, Todorovic A, Stojiljkovic V, and Pajovic SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct* **2008**;26(6):723-730.
240. Marzani B, Pansarasa O, and Marzatico F. "Oxidative stress" and muscle aging: influence of age, sex, fiber composition and function. *European Journal of Applied Physiology* **2004**;14(1):37-44.
241. Tatone C, Carbone MC, Falone S et al. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* **2006**;12(11):655-660.
242. Cho YM, Bae SH, Choi BK, Cho SY, Song CW, Yoo JK, and Paik YK. Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice. *Proteomics* **2003**;3(10):1883-1894.
243. Lee HM, Greeley GH, Jr., and Englander EW. Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats. *Mech Ageing Dev* **2001**;122(4):355-371.
244. O'Connell K, Gannon J, Doran P, and Ohlendieck K. Proteomic profiling reveals a severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle. *Int J Mol Med* **2007**;20(2):145-153.
245. Fleming SE and Gill R. Aging stimulates fatty acid oxidation in rat colonocytes but does not influence the response to dietary fiber. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **1997**;52(6):B318-B330.
246. Zwerschke W, Mazurek S, Stockl P, Hutter E, Eigenbrodt E, and Jansen-Durr P. Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* **2003**;376(Pt 2):403-411.
247. Kang KB, Van Der ZA, Iannazzo L, and Majewski H. Age-related changes in monocyte and platelet cyclooxygenase expression in healthy male humans and rats. *Transl Res* **2006**;148(6):289-294.
248. Chang IC, Chiang TI, Yeh KT, Lee H, and Cheng YW. Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporos Int* **2010**;21(8):1401-1409.
249. Njemini R, Bautmans I, Lambert M, Demanet C, and Mets T. Heat shock proteins and chemokine/cytokine secretion profile in ageing and inflammation. *Mech Ageing Dev* **2007**;128(7-8):450-454.
250. Hoensch H, Peters WH, Roelofs HM, and Kirch W. Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr Med Res Opin* **2006**;22(6):1075-1083.

251. Yang MH, Lo LH, Chen YH, Shiea J, Wu PC, Tyan YC, and Jong YJ. Study of human neutrophil peptides in saliva by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**;23(19):3220-3226.
252. Sheh A, Ge Z, Parry NM et al. 17beta-estradiol and tamoxifen prevent gastric cancer by modulating leukocyte recruitment and oncogenic pathways in Helicobacter pylori-infected INS-GAS male mice. *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**;4(9):1426-1435.
253. Lai TY, Chen LM, Lin JY et al. 17beta-estradiol inhibits prostaglandin E2-induced COX-2 expressions and cell migration by suppressing Akt and ERK1/2 signaling pathways in human LoVo colon cancer cells. *Mol Cell Biochem* **2010**;342(1-2):63-70.
254. Tabuchi Y, Arai Y, Kondo T, Takeguchi N, and Asano S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**;293(4):1287-1294.
255. Tong X, Yin L, and Giardina C. Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**;317(2):463-471.
256. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, and Chambers AF. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal* **2011**;5(2):111-122.
257. Anborgh PH, Wilson SM, Tuck AB et al. New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer: clinical validation and comparison of multiple ELISAs. *Clin Chem* **2009**;55(5):895-903.
258. Kazanecki CC, Kowalski AJ, Ding T, Rittling SR, and Denhardt DT. Characterization of anti-osteopontin monoclonal antibodies: Binding sensitivity to post-translational modifications. *J Cell Biochem* **2007**;102(4):925-935.
259. Kon S, Maeda M, Segawa T et al. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J Cell Biochem* **2000**;77(3):487-498.
260. Crawford HC, Matrisian LM, and Liaw L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Res* **1998**;58(22):5206-5215.
261. Sharma P, Kumar S, and Kundu GC. Transcriptional regulation of human osteopontin promoter by histone deacetylase inhibitor, trichostatin A in cervical cancer cells. *Mol Cancer* **2010**;9(1):178.
262. Cerella C, Sobolewski C, Dicato M, and Diederich M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol* **2010**;80(12):1801-1815.
263. Roy MJ, Dionne S, Marx G, Qureshi I, Sarma D, Levy E, and Seidman EG. In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine. *Nutrition* **2009**;25(11-12):1193-1201.
264. Zhang ZH, Ouyang Q, and Gan HT. Targeting cyclooxygenase-2 with sodium butyrate and NSAIDs on colorectal adenoma/carcinoma cells. *World J Gastroenterol* **2004**;10(20):2954-2957.
265. Russo I, Luciani A, De CP, Troncone E, and Ciacci C. Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of antioxidant defense machinery. *PLoS One* **2012**;7(3):e32841.
266. Sauer J, Richter KK, and Pool-Zobel BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **2007**;18(11):736-745.

267. Sauer J. Molekulare Mechanismen der Kolonkrebprävention: Untersuchungen zum Einfluss von Darmfermentationsprodukten auf Entgiftungsenzyme nicht-transformierter Kolonzellen. *Dissertation* **2007**.
268. Mata J, Marguerat S, and Bahler J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* **2005**;30(9):506-514.
269. Phillips T. Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education* **2008**;1(1).
270. Tong X, Yin L, Joshi S, Rosenberg DW, and Giardina C. Cyclooxygenase-2 regulation in colon cancer cells: modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* **2005**;280(16):15503-15509.
271. Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, and Tanaka M. Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene* **2000**;19(9):1225-1231.
272. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, and Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2007**;13(20):2826-2832.
273. Spehlmann ME and Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* **2009**;25(2):92-99.
274. Murakami M, Kambe T, Shimbara S, and Kudo I. Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* **1999**;274(5):3103-3115.
275. Murakami M, Naraba H, Tanioka T et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **2000**;275(42):32783-32792.
276. Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai HH, Musiek ES, Milne GL, Katkuri S, and DuBois RN. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* **2005**;280(5):3217-3223.
277. Panel V, Boelle PY, yala-Sanmartin J, Jouniaux AM, Hamelin R, Masliah J, Trugnan G, Flejou JF, and Wendum D. Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production. *Cancer Lett* **2006**;243(2):255-263.
278. Seo T, Tatsuguchi A, Shinji S et al. Microsomal prostaglandin E synthase protein levels correlate with prognosis in colorectal cancer patients. *Virchows Arch* **2009**;454(6):667-676.
279. Bartram HP, Scheppach W, Englert S, Dusel G, Richter A, Richter F, and Kasper H. Effects of deoxycholic acid and butyrate on mucosal prostaglandin E2 release and cell proliferation in the human sigmoid colon. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **1995**;19(3):182-186.
280. Gostner A, Dusel G, Kelber E, Scheppach W, and Bartram HP. Comparisons of the anti-proliferative effects of butyrate and aspirin on human colonic mucosa in vitro. *Eur J Cancer Prev* **2000**;9(3):205-211.
281. Sherratt PJ, McLellan LI, and Hayes JD. Positive and negative regulation of prostaglandin E2 biosynthesis in human colorectal carcinoma cells by cancer chemopreventive agents. *Biochem Pharmacol* **2003**;66(1):51-61.
282. Hughes-Fulford M, Tjandrawinata RR, Li CF, and Sayyah S. Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A2 in prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* **2005**;26(9):1520-1526.

283. Jones GM and Mayer RJ. Degradation of glucose-metabolizing enzymes in the rat small intestine during starvation. *Biochem J* **1973**;132(4):657-661.
284. Poole GP and Bloxham DP. The turnover of L-type pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* **1982**;204(1):89-95.
285. Spoden GA, Mazurek S, Morandell D, Bacher N, Ausserlechner MJ, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E, and Zwerschke W. Isozyme-specific inhibitors of the glycolytic key regulator pyruvate kinase subtype M2 moderately decelerate tumor cell proliferation. *Int J Cancer* **2008**;123(2):312-321.
286. Goldberg MS and Sharp PA. Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *J Exp Med* **2012**;209(2):217-224.
287. Guo W, Zhang Y, Chen T, Wang Y, Xue J, Zhang Y, Xiao W, Mo X, and Lu Y. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol* **2011**;137(1):65-72.
288. Iqbal MA and Bamezai RN. Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin. *PLoS One* **2012**;7(5):e36764-
289. Hirsch CL, Smith-Windsor EL, and Bonham K. Src family kinase members have a common response to histone deacetylase inhibitors in human colon cancer cells. *Int J Cancer* **2006**;118(3):547-554.
290. Wei YH, Wu SB, Ma YS, and Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J* **2009**;32(2):113-132.
291. Williams MD, Van RH, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, and Richardson A. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* **1998**;273(43):28510-28515.
292. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, and Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98(5):2278-2283.
293. Yano S and Tierney DF. Butyrate increases catalase activity and protects rat pulmonary artery smooth muscle cells against hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**;164(3):1143-1148.
294. Rosignoli P, Fabiani R, De BA, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA, and Morozzi G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* **2001**;22(10):1675-1680.
295. Stein K, Borowicki A, Scharlau D, and Gleit M. Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells. *Br J Nutr* **2010**;104(8):1101-1111.
296. Borowicki A, Stein K, Scharlau D et al. Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Nutrition* **2010**;103(3):360-369.
297. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, and Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* **2000**;407(6802):390-395.
298. Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Int J Oncol* **2000**;17(1):107-112.

299. Kuninaka S, Ichinose Y, Koja K, and Toh Y. Suppression of manganese superoxide dismutase augments sensitivity to radiation, hyperthermia and doxorubicin in colon cancer cell lines by inducing apoptosis. *Br J Cancer* **2000**;83(7):928-934.
300. Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Pestell RG, Howell A, and Sotgia F. Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs "fertilizer". *Cell Cycle* **2011**;10(15):2440-2449.
301. Goh J, Enns L, Fatemie S, Hopkins H, Morton J, Pettan-Brewer C, and Ladiges W. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC Cancer* **2011**;11191.
302. Lambert DW, Wood IS, Ellis A, and Shirazi-Beechey SP. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer* **2002**;86(8):1262-1269.
303. Tsao AS, Kim ES, and Hong WK. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin* **2004**;54(3):150-180.
304. Hitchler MJ, Oberley LW, and Domann FE. Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* **2008**;45(11):1573-1580.
305. Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW, and Pool-Zobel BL. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer* **2001**;41(1-2):156-164.
306. Petermann A, Miene C, Schulz-Raffelt G, Palige K, Holzer J, Gleis M, and Bohmer FD. GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. *Mol Nutr Food Res* **2009**;53(10):1245-1253.
307. Ritchie KJ, Walsh S, Sansom OJ, Henderson CJ, and Wolf CR. Markedly enhanced colon tumorigenesis in Apc(Min) mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106(49):20859-20864.
308. Thornalley PJ. Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. *Anticancer Drugs* **2002**;13(4):331-338.
309. Yang G, Gao YT, Shu XO et al. Isothiocyanate exposure, glutathione S-transferase polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Am J Clin Nutr* **2010**;91(3):704-711.
310. Hu Y, Kabler SL, Tennant AH, Townsend AJ, and Kligerman AD. Induction of DNA-protein crosslinks by dichloromethane in a V79 cell line transfected with the murine glutathione-S-transferase theta 1 gene. *Mutat Res* **2006**;607(2):231-239.
311. Dang DT, Chen F, Kohli M, Rago C, Cummins JM, and Dang LH. Glutathione S-transferase pi1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Res* **2005**;65(20):9485-9494.
312. Yaku K, Enami Y, Kurajyo C, Matsui-Yuasa I, Konishi Y, and Kojima-Yuasa A. The enhancement of phase 2 enzyme activities by sodium butyrate in normal intestinal epithelial cells is associated with Nrf2 and p53. *Mol Cell Biochem* **2012**;370(1-2):7-14.
313. Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, and Hodin RA. 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.
314. Kiefer J, Beyer-Sehlmeyer G, and Pool-Zobel BL. Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells. *Br J Nutr* **2006**;96(5):803-810.

315. Turjanski AG, Vaque JP, and Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **2007**;26(22):3240-3253.
316. Glinghammar B, Holmberg K, and Rafter J. Effects of colonic luminal components on AP-1-dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* **1999**;20(6):969-976.
317. Sarkar S, Abujamra AL, Loew JE, Forman LW, Perrine SP, and Faller DV. Histone deacetylase inhibitors reverse CpG methylation by regulating DNMT1 through ERK signaling. *Anticancer Res* **2011**;31(9):2723-2732.
318. Ochoa-Zarzosa A, Villarreal-Fernandez E, Cano-Camacho H, and Lopez-Meza JE. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb Pathog* **2009**;47(1):1-7.
319. Kanmura S, Uto H, Numata M et al. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **2009**;15(6):909-917.
320. Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, and Voitenok NN. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* **2000**;11(2):257-266.
321. Liu CY, Lin HC, Yu CT et al. The concentration-dependent chemokine release and pro-apoptotic effects of neutrophil-derived alpha-defensin-1 on human bronchial and alveolar epithelial cells. *Life Sci* **2007**;80(8):749-758.
322. Wang YS, Li D, Shi HS et al. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 mediates antitumor immunity in mice. *Clin Cancer Res* **2009**;15(22):6901-6911.
323. Xu N, Wang YS, Pan WB et al. Human alpha-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. *Mol Cancer Ther* **2008**;7(6):1588-1597.
324. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, and Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* **2003**;4(9):117.
325. Tian Q, Stepaniants SB, Mao M et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* **2004**;3(10):960-969.
326. Orntoft TF, Thykjaer T, Waldman FM, Wolf H, and Celis JE. Genome-wide study of gene copy numbers, transcripts, and protein levels in pairs of non-invasive and invasive human transitional cell carcinomas. *Mol Cell Proteomics* **2002**;1(1):37-45.
327. Kuppen PJ, van der Eb MM, Jonges LE et al. Tumor structure and extracellular matrix as a possible barrier for therapeutic approaches using immune cells or adenoviruses in colorectal cancer. *Histochem Cell Biol* **2001**;115(1):67-72.
328. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, and Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* **2007**;99(19):1441-1454.
329. Bryant PA, Smyth GK, Robins-Browne R, and Curtis N. Detection of gene expression in an individual cell type within a cell mixture using microarray analysis. *PLoS One* **2009**;4(2):e4427.
330. Maier T, Guell M, and Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* **2009**;583(24):3966-3973.
331. Wilhelm A, Jahns F, Bocker S, Mothes H, Greulich KO, and Gleis M. Culturing explanted colon crypts highly improves viability of primary non-transformed human colon epithelial cells. *Toxicology In Vitro* **2011**;26(1):133-141.

332. Chen LC, Hao CY, Chiu YS et al. Alteration of gene expression in normal-appearing colon mucosa of APC(min) mice and human cancer patients. *Cancer Res* **2004**;64(10):3694-3700.
333. Hao CY, Moore DH, Chiu YS, Wong P, Bennington JL, Smith AP, Chen LC, and Lee NM. Altered gene expression in normal colonic mucosa of individuals with polyps of the colon. *Dis Colon Rectum* **2005**;48(12):2329-2335.
334. Hao CY, Moore DH, Wong P, Bennington JL, Lee NM, and Chen LC. Alteration of gene expression in macroscopically normal colonic mucosa from individuals with a family history of sporadic colon cancer. *Clin Cancer Res* **2005**;11(4):1400-1407.

Anhang

Tab. 2: Primersequenzen für die qPCR und Größe der Amplifikate

Gen	Primer (5'→3')	Fragmentgröße
GSTP1	<i>forward</i>	CTG CGC ATG CTG CTG GCA GAT C
	<i>reverse</i>	TTG GAC TGG TAC AGG GTG AGG TC
GSTM2	<i>forward</i>	AGC CGT ATG CAG CTG GCC AAA C
	<i>reverse</i>	CCA CAA AGG TGA TCT TGT CC CA

Tab. 3: Temperaturprofil der qPCR[§]

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	60 °C	30 s	40x
Elongation	72 °C	30 s	

[§] Die Analyse der mRNA-Expression spezifischer *GST*-Gene erfolgte unter Verwendung des iQ Green Supermixes[®] und des iQ5 Multicolor RF PCR Detektionssystems der Firma Bio-Rad.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Franziska Jahns geboren am 24.08.1982 in Altenburg; Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

- seit 03/2012 Projektkoordinatorin am Lehrstuhl für Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 03/2011 – 02/2012 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 09/2007 – 02/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Hochschulausbildung

- 09/2007 – 01/2012 Promotionsstudentin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 10/2001 – 08/2007 Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss als Dipl.-Troph. (Note: 1,4)
- Titel der Diplomarbeit: Untersuchungen zu chemopräventiven Effekten von Polyphenolen aus der Johannisbrotbaumschote in der Kolonadenomzelllinie LT97

Schulausbildung

- 06/2001 Abitur am Lerchenberggymnasium in Altenburg (Note: 2,0)

Praktika

- 02/2005 Universitätsklinikum Jena, Arbeitsgruppe für Molekulare und Zelluläre Biophysik: Untersuchungen zur Reaktion von Tumorzelllinien auf Sauerstoffmangel
- 03/2004 Universitätsklinikum Jena, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
- 08/2003 Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Altenburg, Sachgebiet Fleischhygiene

Jena, 12. Februar 2014

Publikationen

Jahns F, Wilhelm A, Jablonowski N, Mothes H, Greulich KO, Glei M: Butyrate modulates antioxidant enzyme expression in malignant and non-malignant human colon tissues. Eingereicht bei *Molecular Carcinogenesis* am 24.04.2013

Schlörmann W, Hiller B, Jahns F, Zöger R, Hennemeier I, Lindhauer MG, Glei M: Chemopreventive effects of *in vitro* digested and fermented bread in human colon cells. ***Eur J Nutr* 2012**; 108(7):1177-1186.

Jahns F, Wilhelm A, Greulich KO, Mothes H, Radeva M, Wölfert A, Glei M: Impact of butyrate on PKM2 and HSP90 β expression in human colon tissues of different transformation stages: a comparison of gene and protein data. ***Genes Nutr* 2012**; 7(2):235-246.

Wilhelm A, Jahns F, Böcker S, Mothes H, Greulich KO, Glei M: Culturing explanted colon crypts highly improves viability of primary non-transformed human epithelial colon cells. ***Toxicol in Vitro* 2012**; 26(1):133-141.

Jahns F, Wilhelm A, Jablonowski N, Mothes H, Radeva M, Wölfert A, Greulich KO, Glei M: Butyrate suppresses mRNA increase of osteopontin and cyclooxygenase-2 in human colon tumor tissue. ***Carcinogenesis* 2011**; 32(6):913-920.

Radeva MY, Jahns F, Wilhelm A, Glei M, Settmacher U, Greulich KO, Mothes H: Defensin alpha 6 (*DEFA 6*) overexpression threshold of over 60 fold can distinguish between adenoma and fully blown colon carcinoma in individual patients. ***BMC Cancer* 2010**; 10:588-593.

Klenow S, Jahns F, Pool-Zobel BL, Glei M: Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua L.*) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells? ***J Agric Food Chem* 2009**; 57(7):2999-3004.

Beiträge auf wissenschaftlichen Veranstaltungen

Jahns F, Wilhelm A, Radeva M: Modulation of human colon cancer relevant gene expression by nutrition products. **Poster**. FLI Retreat *Molecular mechanisms of senescence and aging*, Bad Blankenburg, Deutschland, 24.-26. Mai **2009**

Jahns F, Radeva M, Wilhelm A, Glei M, Settmacher U, Greulich KO, Mothes H: *DEFA 6* expression bursts in the adenoma stage of colon carcinogenesis. **Vortrag**. Doktoranden-Symposium zur Krebsforschung, Dornburg, Deutschland, 9. Mai **2009**

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich all denjenigen danke sagen, die an der Initiierung und Durchführung dieser Arbeit beteiligt gewesen sind. Mein besonderer Dank geht an Prof. Michael Gleis und Prof. Karl Otto Greulich, die mir während meiner gesamten Promotionszeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere Prof. Gleis hat durch sein Engagement nach dem plötzlichen Tod von Prof. Beatrice L. Pool-Zobel, der ehemaligen Lehrstuhlinhaberin, den Fortgang der Arbeit gesichert und stets unterstützt. Prof. Greulich hat gemeinsam mit Prof. Pool-Zobel das zugrunde liegende Projekt ins Leben gerufen. Durch beide habe ich die Möglichkeit erhalten, als wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudentin am LS für Ernährungstoxikologie sowie partiell am Leibniz-Institut für Altersforschung/Fritz-Lipmann-Institut e. V. (FLI) tätig zu sein. Dafür danke ich beiden vielfach.

Bei meiner Kollegin Anne Wilhelm möchte ich mich für die durchweg gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken. Die Arbeit mit den Kolongewebeproben hat uns immer wieder aufs Neue herausgefordert und wird die gemeinsam erlebte Zeit unvergesslich machen.

Frau Dr. Maria Radeva und den restlichen Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Greulich danke ich vor allem für ihre herzliche Aufnahme, ihre Hilfe beim Zurechtfinden am FLI sowie ihre stete Unterstützung bei fachlichen Problemen oder Fragen.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Herrn Dr. Mothes und seinen Patienten, welche durch die Bereitstellung des Probenmaterials diese Studie überhaupt erst ermöglicht haben.

Meinen ehemaligen Diplomandinnen Nadja und Stefanie sowie meinen Forschungspraktikantinnen Rosalie, Birgit und Theresia, die ich während meiner Zeit am LS für Ernährungstoxikologie betreuen durfte, danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, mit der sie einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Neben ihnen möchte ich auch Kerstin und Esther für ihre zuverlässige und unkomplizierte Hilfe bei der experimentellen Umsetzung spezifischer Fragestellungen vor allem in der Endphase meiner Arbeit danke sagen. Mein Dank gilt darüber hinaus auch allen anderen Mitarbeitern der Lehrstuhls, die gegenwärtig oder ehemals vertreten gewesen sind, für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanke ich mich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Realisierung dieses Projekts.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für ihren Glauben an mich und ihre Unterstützung danke sagen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Jens für seinen stetigen Zuspruch und Rückhalt („Du machst das schon!“).

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt zu haben. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Textabschnitte sind als solche gekennzeichnet. Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind ebenso angegeben.

Ich versichere außerdem, dass ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe, noch dass Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde als Prüfungsarbeit noch nicht für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Außerdem wurde die gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei keiner anderen Hochschule als Dissertation vorgelegt.

Jena, 12. Februar 2014

Franziska Jahns