

Anja Germann
Dr. sc. hum.

Identifizierung genexpressionsregulierender, chemopräventiver Wirkmechanismen in der kolorektalen Karzinomzelllinie CC531 nach Behandlung mit Butyrat und Aspirin

Geboren am 29.12.65 in St.Ingbert

Diplom der Fachrichtung Biologie am 11.11.97 an der Universität des Saarlandes

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. M. v. Knebel Doeberitz

Epidemiologische und experimentelle Studien belegen, dass Butyrat, eine kurzkettige 4-Karbonfettsäure und ein Inhibitor der Histondeacetylase, und Aspirin, ein Acetyl-Salicylsäure-Derivat und ein nicht-selektiver Inhibitor der Cyclooxygenase 1 und 2, eine chemopräventive Wirkung auf die Entstehung kolorektaler Neoplasien besitzen. Beide Substanzen inhibieren die Zellproliferation und induzieren Differenzierung und/oder Apoptose in Kolonkarzinomzellen. Trotz der großen Anzahl an Daten sind die genauen Wirkungsmechanismen, die zu den antitumoralen Eigenschaften beider Substanzen führen, noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Um vorhandene Ergebnisse zu ergänzen, sollten sowohl die molekularen Mechanismen der Einzelsubstanzen als auch Gemeinsamkeiten ihrer antitumoralen Wirkung mittels einer umfassenden Untersuchung in der murinen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie CC531 näher bestimmt werden. Dazu wurden Mutationsanalysen zur näheren Charakterisierung der Zelllinie durchgeführt. In Proliferationstests wurden die benötigten Substanzkonzentrationen bestimmt, die zu einem vollständigen Proliferationsstopp in CC531-Zellen führen. Die leistungsfähige Methode der Oligonukleotid-Mikroarray-Technologie, Northern-Blot-Hybridisierungen und Western-Blot-Analysen dienten der Bestimmung der durch Butyrat- und Aspirin- vermittelten Genexpressionsveränderungen auf mRNA- und Protein-Ebene.

In der CC531-Zelllinie wurde eine heterozygotische Mutation sowohl im β -Catenin- als auch im Ki-Ras-Gen detektiert. Beide genetischen Alterationen führen zu einer konstitutiven onkogenen Aktivierung der betroffenen Signalwege.

Mittels der Mikroarray-Technologie konnte eine umfassende Anzahl von Genen identifiziert werden, die in ihrer Expression durch Butyrat- und Aspirin-Behandlung in CC531-Zellen beeinflusst waren. Insbesondere wurden tief eingreifende Effekte auf die Expression von sieben bekannten Wnt- und/oder Ras-Signalwegzielgenen (Cyclin D1, Cyclin E, c-Myc, Fos11, Folistatin und CD44) nachgewiesen. In allen Fällen hoben Butyrat und Aspirin die

Auswirkungen des Wnt- und Ras-Signalwegs auf, die normalerweise auf die Expression dieser Gene beobachtet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung der CC531-Zellen mit Butyrat und Aspirin nicht nur die Expression einiger Zielgene der Wnt-Signalkaskade verändert wurden, sondern auch translationelle und posttranslationelle Modifikationen der Signalwegs-Effektoren induziert wurden, die zu einer Verminderung der β -Catenin/Tcf4-abhängigen Transkription führten. Basierend auf diesen Beobachtungen, steuern die hier vorgelegten Ergebnisse zusätzliche Anhaltspunkte zu den Mechanismen bei, mittels derer Butyrat und Aspirin vor einer Veränderung von normalem zu Tumorgewebe schützen, da die Aktivierung des Wnt- und Ras-Signalweges frühe Ereignisse in der kolorektalen Karzinogenese darstellen.

Ebenso wurde das Expressionmuster zellzyklusregulierender Gene durch Butyrat und Aspirin in der CC531-Zelllinie verändert. Beide Substanzen verringerten die Expression des Proliferationsmarkers PCNA und erhöhten die mRNA-Level potentieller G1-Zellzyklusstopp-Marker (BTG1, Gadd153, Krox24 und Cyclin D3).

Butyrat und Aspirin erhöhten die Expression der Zellzyklusprogression-blockierenden Proteine p16^{INK4a}, p21^{WAF/CIP1} und p27^{KIP1}. Die Aktivierung der p21^{WAF/CIP1}- und p27^{KIP1}-Expression erfolgte p53-unabhängig, da die CC531-Zelllinie Träger einer homozygoten Deletion im p53-Gen ist, die die DNA-Bindungsstelle des p53-Proteins betrifft. Gleichzeitig wurde eine Verringerung der p53-Expression nach Behandlung mit Butyrat nachgewiesen.

Weiterhin verringerte Butyrat die Expression von Cyclin B und cdc2. Beide Zellzyklus-Regulatoren sind für die Progression des Zellzyklus in der G2-Phase verantwortlich.

Wenngleich zusätzliche Charakterisierungen der Zellliniensysteme und targetspezifische Untersuchungen für ein vollständiges Verständnis und eine komplette Aufklärung der Wirkmechanismen von Butyrat und Aspirin nötig sein könnten, geben die hier präsentierten Daten wichtige Einblicke in die molekularen Mechanismen dieser chemopräventiven Substanzen. Die gefundenen Zielgene stellen eine wichtige molekulare Basis für die Entwicklung neuer und hochspezifischer antitumorale Behandlungsmethoden zur Verfügung. Insbesondere Behandlungsstrategien, die zu einer Aufhebung der tumorigenen Genexpression führen, wie z.B. die Hemmung onkogener Signalwegsaktivierungen oder die Expressionserhöhung von Zellzyklus-Inhibitoren, sollten wertvoll in der Krebstherapie sein. Ebenso müsste die chemische Induzierung solcher Genexpressionsveränderungen für die Chemoprävention überaus nützlich sein. Schließlich könnte eine „genregulierende“

Chemoprävention eine viel versprechende neue Methode in der Krebstherapie darstellen, und Histondeacetylasehemmer und NSAIDs sind aussichtsreiche Kandidaten für solche Ansätze.