

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Gress
Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rüdiger Göke
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg/Lahn



**Molekularbiologische Untersuchungen zum Wirkmechanismus des PPAR- γ Agonisten
Pioglitazon auf die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT-116 und HT-29**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt
von

Harald-Morten Curth
aus Hamburg

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am

04.04.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. B. Lankat-Buttgereit

Koreferent: Prof. Dr. J. Rüschoff

für meine Eltern
Marlies und Erik

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	2
1.1.1	Lokalisation und Staging	3
1.1.2	Metastasierung	4
1.1.3	Klinik	5
1.1.4	Diagnostik	5
1.1.5	Therapie	5
1.1.6	Prognose	6
1.2	Der “peroxisome proliferator-activated receptor” (PPAR)	7
1.2.1	Subtypen von PPAR	9
1.2.2	Lokalisation und Funktion der PPARs	9
1.2.2.1	PPAR- α	9
1.2.2.2	PPAR- β/δ	9
1.2.2.3	PPAR- γ	10
1.3	Der RXR-Rezeptor	11
1.4	Thiozolidindione	11
1.5	Der „TNF-related apoptosis-inducing ligand“	12
1.5.1	TRAIL-Rezeptoren	12
1.5.2	Die Funktion von TRAIL	13
1.5.3	Die Rolle von TRAIL in der Therapie von Karzinomen	16
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	Material	18
2.1	Chemikalien	19
2.2	Einwegartikel	20
2.3	Lösungen	20

3	Methoden.....	30
3.1	Kultivierung der Zellen	31
3.1.1	Zelllinien.....	31
3.1.1.1	HCT-116 Zelllinie	31
3.1.1.2	HT-29 Zelllinie.....	31
3.1.2	Kulturbedingungen	31
3.1.3	Kryokonservierung der Zellen.....	32
3.1.4	Auftauen der Zellen	32
3.1.5	Passagieren der Zellen	32
3.2	Proliferationsanalysen	33
3.2.1	MTT-Assay.....	34
3.2.2	LDH-Assay	35
3.3	Wachstumsanalysen in Anwesenheit des PPAR- γ Antagonisten GW9662	36
3.4	Durchflusszytometrische Analysen	37
3.4.1	Bestimmung der Zellzyklusverteilung.....	37
3.4.1.1	Ernten und Fixieren der Zellen.....	37
3.4.1.2	RNase Verdau und Propidiumiodid-Färbung	38
3.4.1.3	Messung der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometer	38
3.4.2	Bestimmung der spezifischen Apoptose.....	39
3.5	Proteinchemische Methoden.....	40
3.5.1	Ernten der Zellen und Herstellung von Gesamtproteinextrakten	40
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten	40
3.5.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	40
3.5.3.1	Isoelektrische Fokussierung	41
3.5.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.5.3.3	Silberfärbung	42
3.5.3.4	Färbung mit kolloidalem Coomassie Blau	42
3.5.3.5	Phosphoprotein-Färbung	43
3.5.3.6	In-Gel-Verdau von Proteinen	43
3.5.3.7	MALDI-TOF MS Peptid-Fingerprint-Analyse	45

3.5.4	Western-Blot.....	46
3.5.4.1	Auftrennung der Proteine und Blotting	46
3.5.4.2	Ponceau S-Färbung.....	47
3.5.4.3	Detektion	47
3.5.5	Immunpräzipitation	48
3.6	Molekularbiologische Methoden.....	49
3.6.1	RNA-Isolierung	49
3.6.2	RT-PCR und PCR.....	49
3.6.3	Transformation und Selektionierung	51
3.6.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	52
3.6.5	Restriktionsverdau von DNA	52
3.6.6	DNA-Sequenzierung	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Wachstumshemmung der kolorektalen Zelllinien HCT-116 und HT-29 bei Behandlung mit Pioglitazon.....	55
4.1.1	Wachstumsverhalten von HCT-116 und HT-29 Zellen unter der Behandlung mit Pioglitazon	55
4.1.2	Messung der LDH-Aktivität in den Überständen von mit Pioglitazon behandelten HCT-116 und HT-29 Zellen.....	57
4.2	Expression von PPAR- γ in HCT-116 Zellen.....	58
4.2.1	Untersuchungen zur PPAR- γ -Abhängigkeit der Pioglitazon-Wirkung in HCT-116 und HT-29 Zellen.....	58
4.3	Apoptose- und Zellzyklusuntersuchungen	65
4.3.1	Zellzyklusuntersuchungen Pioglitazon-behandelter HCT-116 Zellen	65
4.3.1.1	Wirkung von Pioglitazon auf die Expression Zellzyklus-regulierender Proteine in HCT-116 Zellen	68
4.3.1.1.1	cdk4 und Cyclin D ₃	69
4.3.1.1.2	p21 ^{cip1/waf1}	70
4.3.1.1.3	cdc2	70

4.3.2 Apoptoseverhalten Pioglitazon-behandelter HCT-116 Zellen	71
4.3.2.1 Wirkung von Pioglitazon auf die Expression von pro- apoptotischen Proteinen	72
4.3.2.2 Wirkung von Pioglitazon auf die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase PARP	75
4.3.2.3 Wirkung des Tumornekrosefaktor-assoziierten Apoptose- induzierenden Liganden (TRAIL) auf HCT-116 Zellen	76
4.3.2.4 Wirkung des Tumornekrosefaktor-assoziierten Apoptose- induzierenden Liganden (TRAIL) auf HT-29 Zellen.....	78
4.4 Untersuchung der Proteinexpression und -phosphorylierung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in HCT-116 Zellen	79
4.5 Massenspektrometrische Untersuchungen	83
4.6 Wirkung von Pioglitazon auf die Phosphorylierung von Zytokeratin 19 in HCT-116 Zellen	86
4.6.1 Die Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19 ist PPAR- γ unabhängig .	88
4.7 Wirkung von Pioglitazon auf die Proteinexpression von pcd4 in HCT-116 Zellen	89
4.7.1 Die Transfektion von HCT-116 Zellen mit siRNA gegen pcd4 führt zu einer Wachstumshemmung.....	91
5 Diskussion.....	94
5.1 Wirkung von Pioglitazon auf das Wachstum von HCT-116 und HT-29 Zellen..	95
5.2 Wirkung von Pioglitazon auf den Zellzyklus von HCT-116 Zellen	96
5.3 Wirkung von Pioglitazon auf das Apoptose-Verhalten von HCT-116 Zellen ...	101
5.4 Wirkung von Pioglitazon auf die Phosphorylierung von Zytokeratin 19.....	103
5.5 PPAR- γ Aktivierung als Therapieoption bei Tumoren	104
Literaturverzeichnis	106

Anhang	121
A Abkürzungen	121
B Einheiten.....	123
Zusammenfassung	124
Abstract	126
Lebenslauf	128
Verzeichnis der akademischen Lehrer	130
Danksagung	131
Ehrenwörtliche Erklärung	133

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Mit einem Anteil von 10-15% aller malignen Erkrankungen stellt das kolorektale Karzinom (KRK) weltweit eine der häufigsten Neoplasien dar. Die Anzahl der Neuerkrankungen am kolorektalen Karzinom beträgt in den westlichen Industrienationen 20-40:100000 Menschen bei steigender Inzidenz und ist nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen das zweithäufigste Karzinom¹⁵. Das Haupterkrankungsalter findet sich zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr^{86,178}.

Während nur 5-10% der KRK genetisch bedingt sind, wie etwa bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und „hereditary nonpolyposis colorectal cancer“ (HNPCC)¹¹⁹, spielen in der westlichen Welt vor allem Ernährungsfaktoren eine wesentliche Rolle. Als Risikofaktoren werden fett- und eiweißreiche Kost mit wenig Ballaststoffen angenommen sowie Rauchen und Übergewicht⁷². Bei ca. 80% der kolorektalen Karzinome handelt es sich um Adenokarzinome. Sie entstehen meist auf dem Boden vorbestehender Adenome nach dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz: Hierbei kommt es im Verlauf von Jahren zu einer Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen. Es handelt sich dabei um eine Aktivierung von Onkogenen, wie k-ras, und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen, wie APC (engl. Abk.: „adenomatosis polyposis coli protein“), dcc (engl. Abk.: „deleted in colon carcinoma“) und p53⁵¹ (siehe Abb. 1.1).

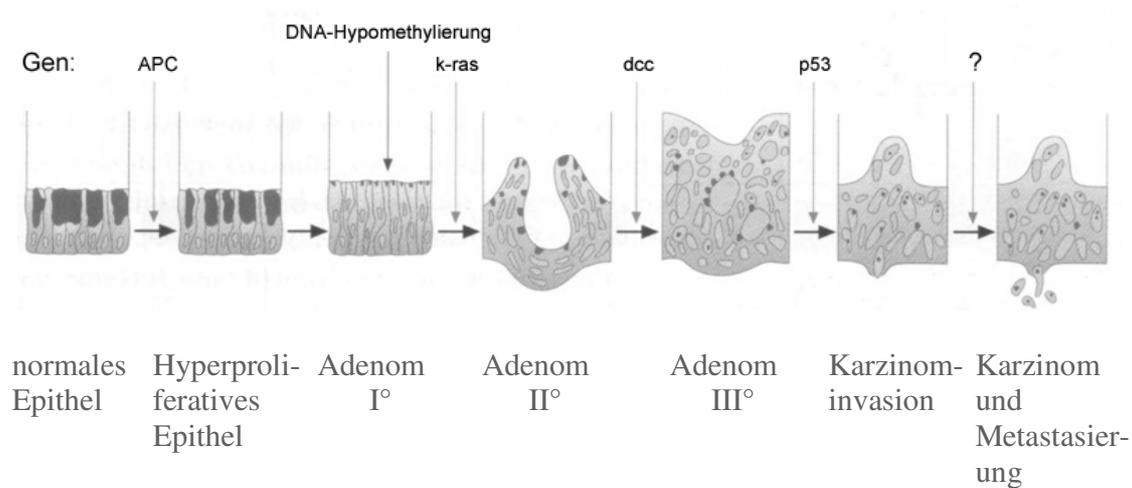


Abb. 1.1: Adenom-Karzinom-Sequenz modifiziert nach Faeron & Vogelstein 1990⁵⁰

Genetische Veränderungen im APC-Gen zählen zu den frühen genomischen Veränderungen in der Adenom-Karzinom-Sequenz. Desweiteren folgen beim Übergang vom Adenom zum Karzinom Mutationen des k-ras-Onkogens und des dcc-Tumorsuppressor-Gens. Inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 können in mehr als 50% der kolorektalen Karzinome als spätes Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz nachgewiesen werden. Ist eine kritische Gesamtzahl an genetischen Veränderungen eingetreten, kann das anfangs noch kontrollierte Wachstumsverhalten in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen.

Als Präkanzerosen gelten große singuläre Polypen, mit Adenomen vergesellschaftete hereditäre Polyposis-Syndrome sowie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen⁷⁵.

1.1.1 Lokalisation und Staging

60 % aller kolorektalen Karzinome sind im Rektum lokalisiert. Hiervon sind wiederum ca. 50% rektal-digital tastbar, weshalb der regelmäßigen Vorsorgeuntersuchung ein hoher Stellenwert zukommt. Weitere 20% der kolorektalen Karzinome sind im Sigma, jeweils 10% im Coecum, bzw restlichem Kolon lokalisiert. Die Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach der „Union International Contre le Cancer“ (UICC), nach Dukes

und nach dem TNM-System (T= Invasionstiefe, N= Lymphknotenbefall und M= Fernmetastasierung).

UICC-Stadium	Definition	TNM-System			Dukes
0	Carcinoma in situ	TIS	N ₀	M ₀	
I	Ia Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	T ₁	N ₀	M ₀	A
	Ib Infiltration Muscularis propria	T ₂	N ₀	M ₀	
II	Infiltration aller Wandschichten	T ₃	N ₀	M ₀	B
	Überschreitung der Darmwand	T ₄	N ₀	M ₀	
III	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	T _X	N ₁₋₃	M ₀	C
IV	Fernmetastasen	T _X	N _X	M ₁	D

Tab. 1.1: Einteilung der Tumorstadien

Weitere Hinweise über die Prognose eines Tumors erlaubt der histologische Differenzierungsgrad G₁-G₃ (G₁: gut differenziert, G₂: mäßig differenziert und G₃: undifferenziert). Hierbei ist die Prognose umso schlechter, je weniger die Zellen differenziert sind.

1.1.2 Metastasierung

Je nach Tumorlokalisation erfolgt die hämatogene Metastasierung entlang der V. portae in die Leber, bzw. über die V. cave in die Lunge. Erst später sind andere Organe, Knochen oder Gehirn befallen. Die lymphogene Metastasierung erfolgt zunächst in die regionalen Lymphknoten. Dabei ist die Prognose umso ungünstiger, je tiefer das Karzinom sitzt. Bei ca. 25% der Patienten hat das Karzinom bereits zum Diagnosezeitpunkt gestreut, mehr als 50% entwickeln im Verlauf der Krankheit Lebermetastasen⁷⁵.

1.1.3 Klinik

Die Symptome eines kolorektalen Karzinoms sind unspezifisch. Frühsymptome bestehen nicht. Hinweise auf das Vorliegen eines KRK können sein:

- Blutbeimischung zum Stuhl
- Änderungen der Stuhlgewohnheiten bei Patienten >40 Jahre
- Leistungsminderung, Gewichtsverlust
- Ileussyptomatik (Spätsymptom)
- Anämie

1.1.4 Diagnostik

Diagnostisch wegweisend ist die rektal-digitale Untersuchung und vor allem die komplette Koloskopie, die neben dem direkten Nachweis auch die bioptische Sicherung ermöglicht. Die Beurteilung der Tumorausdehnung und Operabilität erfolgt durch die transrektale Sonographie in Verbindung mit einer Computertomographie (CT) des Abdomens in Doppelkontrast-Technik. Zum Ausschluss von Fernmetastasen werden vor allem abdominelle Sonographie, Angio-CT oder -MRT der Leber, CT-Thorax, Röntgenthorax-Aufnahme sowie die Skelettszintigraphie eingesetzt. Ein wichtiges Mittel, um die Mortalität des KRK zu senken, ist die Früherkennung. Durch randomisierte Studien ist belegt, dass ein routinemäßiges Screening mittels Testung auf okkultes Blut¹⁰⁵ oder durch Sigmoidoskopie¹⁴⁹ die Mortalität des kolorektalen Karzinoms senkt.

1.1.5 Therapie

Die Therapie besteht in erster Linie in der En-bloc-Resektion des tumortragenden Kolonabschnitts und Mesenteriums unter Einhaltung einer Sicherheitszone normalen Gewebes. Ziel der kurativen Operation muss eine R₀-Resektion, also eine totale Entfernung aller malignen Zellen sein. Gleichzeitig wird das regionale Lymphabflussgebiet mit entfernt. Dieser kurative Ansatz kann - je nach Tumorlokalisation - eine Hemikolektomie

bzw. eine Kolon-Transversumresektion notwendig machen und eignet sich insbesondere für die TNM-Tumorstadien 1-3. In einigen Fällen kann auch bei kolorektalen Karzinomen im Stadium T₄ durch eine neoadjuvante Radio-/Chemotherapie eine kurative R₀-Resektion erreicht werden. Ab Stadium UICC III wird adjuvant eine Chemotherapie zur Reduktion des Lokalrezidiv-Risikos und der Fernmetastasierung verabreicht. Eingesetzt werden vor allem 5-Fluorouracil in Kombination mit Folinsäure⁷⁵. Bei Fernmetastasierung verspricht eine palliative Chemotherapie mit 5-Fluorouracil eine Tumorregression mit Verlängerung der Überlebenszeiten von im Mittel 5-6 Monaten.

1.1.6 Prognose

Die Prognose des KRK ist wesentlich von dem Stadium bei Diagnosestellung, sowie von der Erfahrung des Operators abhängig. Einen Überblick über die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom UICC-Stadium gibt Abb. 1.2.

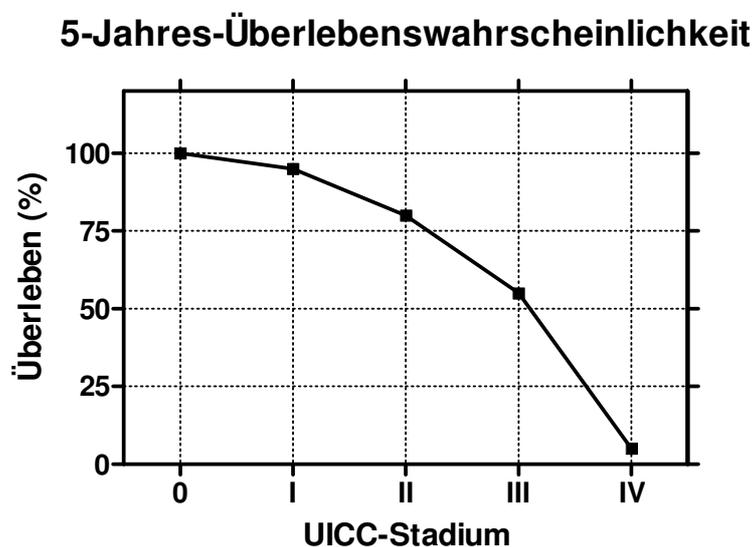


Abb. 1.2: 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom Tumorstadium

1.2 Der “peroxisome proliferator-activated receptor” (PPAR)

PPARs gehören zu der Gruppe der hormonabhängigen nukleären Transkriptionsfaktoren^{82,102,147} und sind Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie¹²¹, zu der auch der Östrogen-, Vitamin D₃- und Thyroxin-Rezeptor gehören. Wie andere Kernrezeptoren verfügen PPARs über vier Hauptdomänen (siehe Abb. 1.3): Das N-terminalen Ende (A/B) besitzt eine Liganden-unabhängige Transkriptions-Aktivierungsfunktion (AF-1) mit einer „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Phosphorylierungsstelle¹. Durch Phosphorylierung an dieser Stelle wird die Fähigkeit zur Bindung von Liganden erniedrigt und damit auch die Transkriptionsaktivität der PPARs¹⁵⁰. Der AF-1 Region folgt eine ca. 70 Aminosäuren lange, hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD, C), bestehend aus zwei Zinkfinger-Domänen, über die die Bindung an die DNA erfolgt. Der DBD folgt die Gelenkdomäne (D), die DBD und Ligandenbindungsdomäne (LBD) miteinander verbindet. Am C-terminalen Ende der PPARs findet sich schließlich die E/F-Domäne, welche eine Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion (AF-2) besitzt⁴⁶.

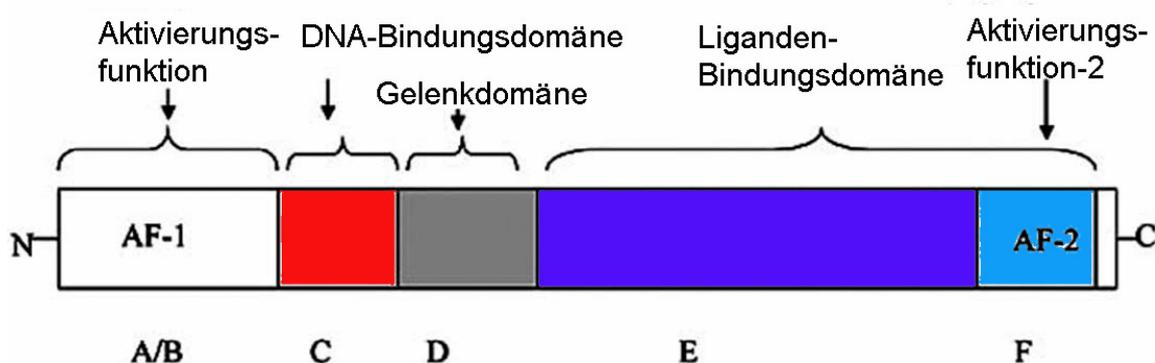


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von PPAR modifiziert nach Alarcon et al. 2004⁴

Die Regulation der Transkription von PPAR-Zielgenen erfolgt durch Bindung des Transkriptionsfaktors an charakteristische DNA-Sequenzen, die „peroxisome proliferator response elements“ (PPREs), welche in der Promoterregion dieser Gene lokalisiert sind^{133,171,191} (siehe Abb. 1.4). Die Bindung des PPAR an sein spezifisches PPRE erfolgt in Form eines Heterodimers mit dem „retinoid X receptor“ (RXR)⁹⁹. Die Transkription der Zielgene erfolgt sowohl durch Bindung eines Liganden an PPAR, als auch an den RXR. Haben beide Rezeptoren einen Liganden gebunden, resultiert hieraus ein additiver Effekt^{36,94}. Desweiteren bestimmen die DNA-Sequenz des PPRE, der PPAR-, bzw. RXR-Subtypus sowie der an den jeweiligen Rezeptor gebundene Ligand die Spezifität des PPAR/RXR-Heterodimers⁸⁹.

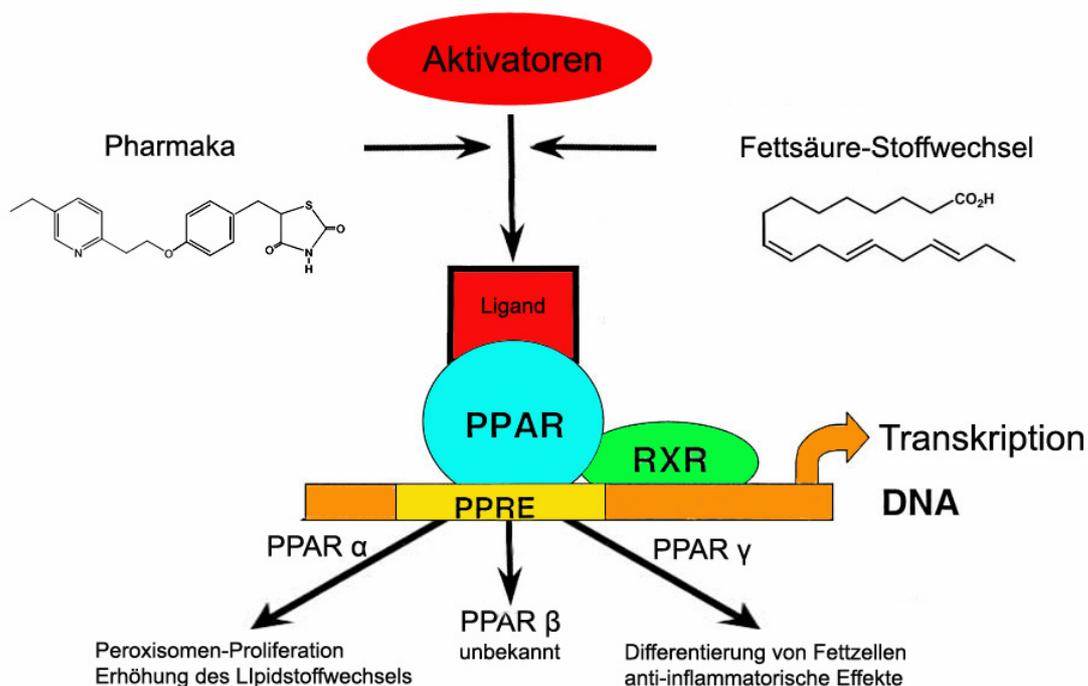


Abb. 1.4: Übersicht über die Wirkweise des PPAR/RXR Heterodimers; modifiziert nach Houseknecht et al. 2002⁸⁰

PPAR = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PPRE = PPAR Response Element

RXR = Retinoid X Receptor

1.2.1 Subtypen von PPAR

1990 klonierten Issemann und Green zum ersten Mal eine PPAR cDNA aus einer Mäuseleber⁸², wobei es sich, wie sich herausstellte, um den PPAR- α Subtypus handelte. Wenig später gelang Dreyer die Klonierung von zwei weiteren, dem PPAR- α Rezeptor ähnlichen Rezeptoren, welche er PPAR- β und PPAR- γ nannte³⁸. Bislang konnten drei PPAR-Subtypen identifiziert werden, nämlich PPAR α , β (auch als δ -Typ bezeichnet) und γ . Innerhalb ihrer DNA-Bindungsstelle zeigen die drei PPARs eine 80%ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz, während die Aminosäuresequenz der Liganden-Bindungsstelle, anhand welcher die Einteilung in die einzelnen Subtypen erfolgt, nur zu 65% identisch ist³⁷.

1.2.2 Lokalisation und Funktion der PPARs

1.2.2.1 PPAR- α

Das Gen des humanen PPAR- α wurde auf Chromosom 22 lokalisiert¹⁵¹ und wird vor allem in der Leber und in Zellen mit hohem Fettsäurestoffwechsel wie Niere, Herz, Skelettmuskel und braunem Fettgewebe^{17,63} exprimiert. Seine Funktion liegt vor allem in der Kontrolle der Transkription von Enzymen, die an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind^{38,93}. Natürliche Liganden für PPAR- α sind langkettige, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren⁷⁸. Zu den Medikamenten, die über den PPAR- α Subtypus wirken, gehören die Fibrate, welche bei der Therapie der Hypertriglyceridämie eingesetzt werden.

1.2.2.2 PPAR- β/δ

Die Klonierung von PPAR- β cDNA erfolgte 1992 durch Schmidt¹⁴⁶. Das zugehörige Gen konnte auf Chromosom 6p21 lokalisiert werden¹⁹⁰. PPAR- β kommt in vielen unterschiedlichen Geweben vor, unter anderem im Gehirn, Fettgewebe, Haut, Niere, Herz und Verdauungstrakt^{5,17,36,45,123}. Trotz des ubiquitären Vorkommens und der Aktivierung

durch ähnliche Liganden wie PPAR- α , konnten bislang nur wenige PPAR- β spezifische Zielgene identifiziert werden. So ist die Aktivierung von PPAR- β bei der Ubiquitinierung von Proteinen involviert⁹⁵. Außerdem scheint PPAR- β eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Fettzellen zu spielen^{11,85}.

1.2.2.3 PPAR- γ

PPAR- γ ist der am besten untersuchte nukleäre Hormonrezeptor. Das Gen für menschliches PPAR- γ wurde auf Chromosom 3p25 lokalisiert, ganz in der Nähe des Retinsäure-Rezeptors RAR- β (3p24) und des Thyroid-Rezeptors TR- β (3p21)^{12,67}. Bisher sind hunderte Zielgene für PPAR- γ bekannt, wovon die meisten an der Adipogenese²¹, dem Glukose-Stoffwechsel¹⁴¹ und der Angiogenese⁴⁹ beteiligt sind. PPAR- γ wird auf mRNA-Ebene in die drei Isoformen γ 1, γ 2 und γ 3 unterteilt, welche durch alternatives Splicing aus dem gleichen Gen abgeleitet werden⁴⁷. Er kommt hauptsächlich in Adipozyten, Hepatozyten, Kolonepithelzellen und Makrophagen vor, wobei es sich vor allem um die Subtypen γ 1 und γ 3 handelt. Lediglich Adipozyten exprimieren einen höheren Anteil von PPAR- γ 2, welcher hier etwa 20% der Gesamtmenge an PPAR- γ ausmacht³⁹. PPAR- γ wird sowohl von natürlich vorkommenden Liganden aktiviert, wie etwa 15-Desoxy-Delta-(12,14)-Prostaglandin J₂^{53,100}, als auch von synthetischen wie den Thiazolidindionen¹⁴ und bestimmten Nicht-steroidalen Antiphlogistika¹¹². Auch von freien Fettsäuren ist bekannt, dass sie in der Lage sind, PPAR- γ zu aktivieren, wobei mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine höhere Bindungsaffinität zu dem Rezeptor haben, als einfach ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren^{64,101}. Seit der Entwicklung spezieller synthetischer PPAR- γ Agonisten wie den Thiazolidindionen, häufen sich außerdem die Hinweise, dass PPAR- γ eine bedeutende Rolle bei der Karzinogenese spielt.

1.3 Der RXR-Rezeptor

Auch die Familie der RXR umfasst drei unterschiedliche Subtypen, die ihrerseits wieder in zwei Isoformen vorliegen, nämlich RXR- α , RXR- β und RXR- γ . RXR wird in vielen Geweben exprimiert, wie Fettzellen⁹⁰, Hepatozyten^{168,170}, Niere¹⁸⁸, Herzmuskel¹⁶⁰ und Kolonmukosa⁹¹. Als natürlicher Ligand des RXR wurde 9-cis-Retinsäure ausgemacht^{77,113}. Einige RXR zeigen eine gewisse Spezifität für bestimmte PPAR, die hauptsächlich auf eine stabilere Bindung innerhalb des Heterodimers beruht, prinzipiell ist jedoch jeder RXR in der Lage mit jedem PPAR zu interagieren⁸⁹.

1.4 Thiozolidindione

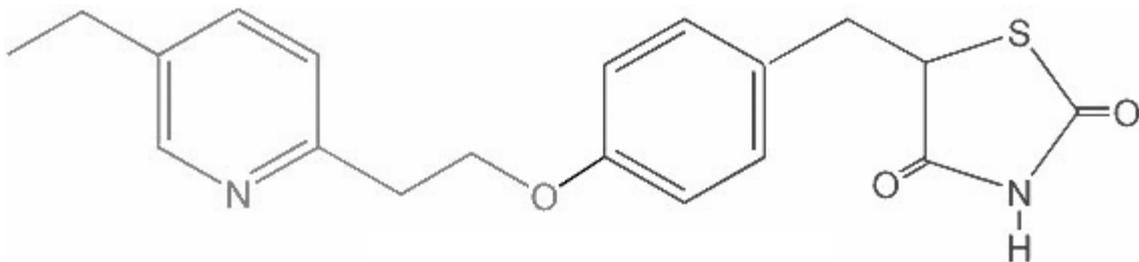


Abb. 1.5: Strukturformel von Pioglitazon

Thiazolidindionen (TZDs), zu denen unter anderem Pioglitazon (Actos®, siehe Abb. 1.5), Rosiglitazon (Avandia®) und Troglitazon (Rezulin®) gehören, werden klinisch als orale Antidiabetika beim nicht insulinabhängigem Typ-II-Diabetes eingesetzt⁵⁵. Troglitazon, der erste Insulinsensitizer, wurde wegen schwerer Hepatotoxizität (bis hin zum Leberversagen) nicht in den Markt eingeführt. TZDs entfalten ihre Wirkung nicht über eine erhöhte Insulinsekretion aus dem Pankreas, wie etwa die Sulfonylharnstoffe, sondern senken die Blutglukosekonzentration über einer erhöhte Ansprechbarkeit peripherer Insulinrezeptoren, wirken also als so genannte Insulin-Sensitizer. TZDs zeigen eine hohe Affinität für den „peroxisome proliferator-activated receptor“ (PPAR)- γ (siehe 1.2.2.3). In den letzten Jahren häuften sich Hinweise darauf, dass TZDs nicht nur antidiabetische Effekte besitzen,

sondern auch in der Lage sind, Zellzyklusarrest, Apoptose und die Differenzierung einiger menschlicher Karzinome zu induzieren. Im Laufe der Jahre konnte ein Zellwachstum-hemmender Effekt auf Karzinome der Brust⁴², Prostata¹⁰⁸, Lunge¹⁶⁷, Magen¹⁴⁵, Blase⁶⁸ und Pankreas¹²⁶ gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass die Aktivierung von PPAR- γ eine mögliche Rolle bei der Karzinom-Behandlung spielen kann. Neben diesen PPAR- γ abhängigen Effekten wurden für die Gruppe der TZDs auch PPAR- γ unabhängige Wirkungsweisen nachgewiesen^{169,180}

1.5 Der „TNF-related apoptosis-inducing ligand“

1995 und 1996 wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen ein Protein entdeckt, welches über eine starke Fähigkeit zur Induktion von Apoptose verfügte. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu anderen Angehörigen der TNF-Familie wurde es „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL), bzw. Fas/Apo-1 genannt^{139,183}. Humanes TRAIL besteht aus 281 Aminosäuren und wird als Typ-II Transmembranprotein exprimiert mit einer kurzen zytoplasmatischen N-terminalen Domäne und extrazellulär mit einer langen, C-terminalen Rezeptorbindungsdomäne. Die höchste Expressionsrate von TRAIL findet sich in Zellen des Immunsystems, wo es eine Rolle bei der zellulär-vermittelten Lyse von Virus-infizierten und tumorös veränderten Zellen spielt^{73,84,158}.

1.5.1 TRAIL-Rezeptoren

Der erste TRAIL-Rezeptor (TRAIL-R1, „death-rezeptor 4“= DR4) wurde 1997 von Pan et al. entdeckt¹³⁷. Noch im selben Jahr konnte ein weiterer Apoptose-induzierender Rezeptor für TRAIL (TRAIL-R2, auch Killer, TRICK2 und DR5 genannt) identifiziert werden^{148,153,174,184}. Auf der zytoplasmatischen Seite besitzen beide Rezeptoren eine für Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie typische Domäne, welche Todesdomäne (DD für engl. „death domain“) genannt wird. Diese Todesdomäne fehlt bei TRAIL-R3 (LIT, DcR1), bzw. ist bei TRAIL-R4 (TRUNDD, DcR2) nur als verkürzter, funktionsloser Rest vorhanden (siehe Abb. 1.6). Sie finden sich vor allem auf der Oberfläche von

gesunden Zellen und dienen dort in Form von so genannten „Decoy“-Rezeptoren (engl. = Schein-Rezeptoren) dem Schutz vor Apoptose^{31,33,122,134}. Schließlich existiert noch ein fünfter TRAIL-Rezeptor, auch Osteoprotegerin (OPG) genannt⁴³. Letzterer ist der einzige lösliche TRAIL-Rezeptor und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten^{44,157}.

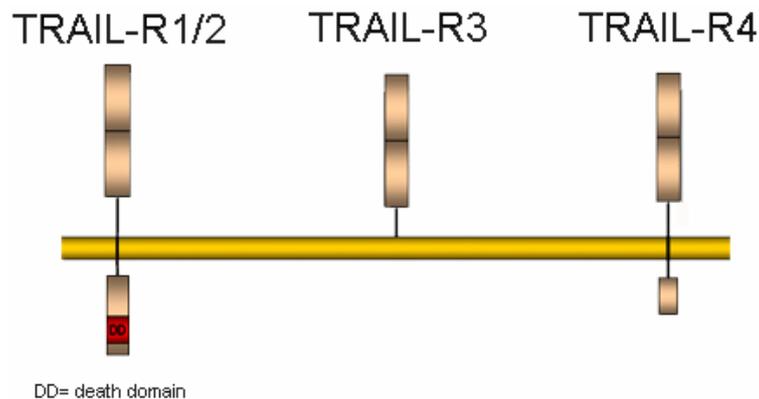


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der TRAIL-Rezeptoren R1-R4

1.5.2 Die Funktion von TRAIL

Die Aktivierung von Caspasen, einer Familie von Cystein-Proteasen, welche spezifisch hinter Aspartat-Resten spalten, spielt eine zentrale Rolle während der Apoptose¹⁶⁵. Dabei werden zwei Hauptwege unterschieden: Beim intrinsischen Apoptoseweg kommt es durch eine Vielzahl von Stressoren, wie Bestrahlung oder Behandlung mit genotoxischen Substanzen, zu denen auch die Chemotherapeutika gehören, zu einer Instabilität der Mitochondrienmembran und infolge dessen zu einer Freisetzung von Cytochrom c und Smac in das Zytoplasma, wodurch die Initiator-Caspase 9 aktiviert wird⁶⁵. Der zweite, extrinsische Weg wird direkt durch die Bindung von Liganden an so genannte „Todesrezeptoren“ vermittelt und beinhaltet die Aktivierung von Caspase 8 und 10⁸.

TRAIL wirkt vor allem über den extrinsischen Apoptoseweg. Die Bindung von TRAIL an die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 bewirkt eine Trimerisierung dreier Rezeptoren, und dadurch die Bildung des „death-inducing signalling complex“ (DISC)^{97,138}. An diesen

Komplex kann nun FADD binden, ein Adaptermolekül bestehend aus 208 Aminosäuren, welches seinerseits über eine DD verfügt (siehe Abb. 1.7). Mit Hilfe einer zweiten funktionellen Domäne, der „death effector domän“ (DED) ist FADD in der Lage, Procaspase-8 und -10 zu binden, wodurch diese aktiviert werden^{25,159}. Diese Aktivierung ist wesentliche Voraussetzung für die Transmission des apoptotischen Signals. Aktivierte Caspase-8 besitzt zwei wesentliche zelluläre Substrate, nämlich Caspase-3 und Bid, ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie. Durch Spaltung von Caspase-3 wird eine Caspase-Kaskade in Gang gesetzt, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führt¹²⁹. Die Spaltung von Bid andererseits stellt das Bindeglied zwischen dem Rezeptor-vermittelten, extrinsischen und dem Rezeptor-unabhängigen, intrinsischen Apoptoseweg dar^{115,118}. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung anderer pro-apoptotischer Enzyme der Bcl-2 Familie wie Bax und Bad^{23,26}. Diese Proteine kontrollieren die Freisetzung von Cytochrom c und Smac, und somit zusammen mit dem Adapterprotein Apaf1 die Aktivität von Caspase-9¹¹⁶. Auch dieser sogenannte intrinsische Apoptoseweg führt letztendlich zur Aktivierung von Caspase-3 und somit zur Apoptose^{28,176}.

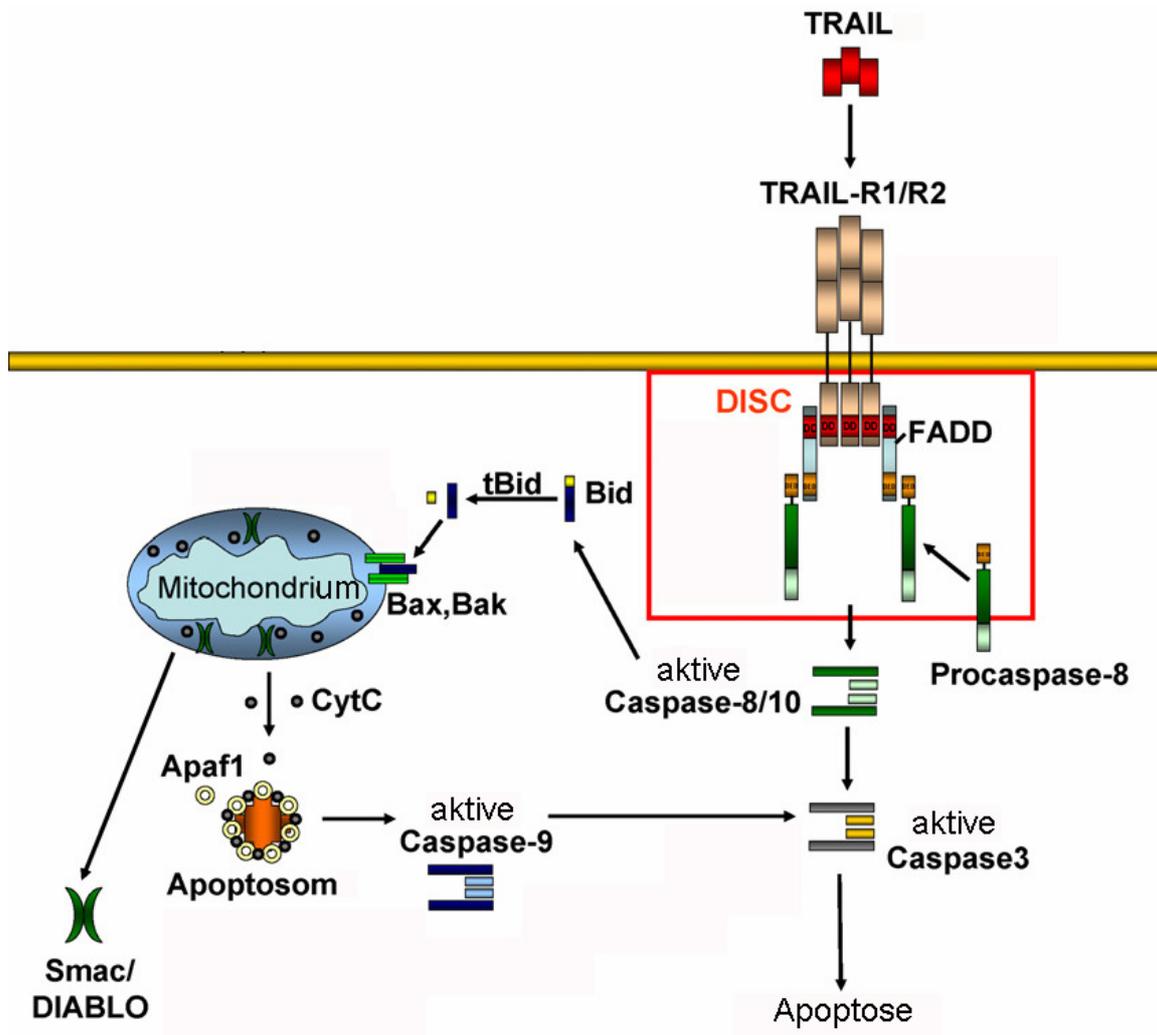


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges der durch TRAIL vermittelten Apoptose, modifiziert nach Falschlehner et al. 2007⁴⁸.

1.5.3 Die Rolle von TRAIL in der Therapie von Karzinomen

Eine der herausragenden Eigenschaften von TRAIL ist seine Selektivität gegenüber Tumorzellen. Obwohl TRAIL und TRAIL-Rezeptoren auch auf normalen Zellen vorhanden sind¹⁸², führt die Aktivierung von TRAIL-R1/2 nur bei maligne transformierten Zellen zur Induktion von Apoptose, wohingegen gesunde Zellen unbeeinflusst bleiben¹⁵⁴. Eine mögliche Erklärung für diese Selektivität gegenüber Tumorzellen könnte die erhöhte Expression der „Decoy“-Rezeptoren auf der Oberfläche von gesunden Zellen sein, welche mit TRAIL-R1 und -R2 um die Bindung von TRAIL konkurrieren, im Gegensatz zu diesen jedoch kein apoptotisches Signal vermittelt^{32,135,136,152}.

Aufgrund dieser Beobachtungen wuchs die Hoffnung, durch gezielte Induktion von Apoptose mittels Aktivierung von Todesrezeptoren eine zusätzliche Therapieoption bei der Behandlung von Krebsleiden in der Hand zu haben. Tatsächlich konnte in einigen in vivo Studien eine deutliche Tumorregression unter dem Einsatz von rekombinanten, löslichen TRAIL gezeigt werden^{9,175}. In Karzinomen der Brust⁹², des Kolon⁵⁹, beim Karposi-Sarkom¹²⁵ und beim hepatozellulären Karzinom⁵⁶ konnte dieser antineoplastische Effekt durch die kombinierte Gabe von TRAIL mit anderen Chemotherapeutika, u.a. Doxorubicin, Etoposid und 5-Fluorouracil, noch erhöht werden. Dieses Phänomen wird auf eine durch DNA-Schädigung bedingte Hochregulation von TRAIL-R2 zurückgeführt^{96,181}. Außerdem konnte durch Bestrahlung eine Sensitivierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose bei humanen Lymphomzellen beobachtet werden¹³.

Ob die Gabe von rekombinantem TRAIL tatsächlich eine wirksame Ergänzung zu bisherigen Chemotherapieschemata sein kann, wird zurzeit jedoch kontrovers diskutiert, da einige Studien den Verdacht einer Toxizität von TRAIL auf humane Hepatozyten nahelegen^{88,109}.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Frühere Studien zeigten einen wachstumshemmenden Effekt von PPAR- γ Agonisten auf diverse Zelllinien, wobei diese Effekte Zelllinien-abhängig entweder über die Induktion von Apoptose, oder über die Modulation von am Zellzyklus beteiligten Enzymen erfolgten. Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, über die Pioglitazon das Wachstum der humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT-116 und HT-29 beeinflusst. Hierzu wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert und mit Pioglitazon inkubiert. Der Effekt auf das Zellwachstum wurde anschließend mittels MTT- und LDH-Assay dokumentiert. Da für Pioglitazon sowohl PPAR- γ abhängige, als auch unabhängige Wirkungen beschrieben worden sind, wurde die PPAR- γ Abhängigkeit von Pioglitazon auf die verwendeten Zelllinien mit Hilfe des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 überprüft. Desweiteren wurden Zellzyklus-Verteilungen und spezifische Apoptoseraten mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen ermittelt. Anschließend wurden Western-Blot Analysen und zweidimensionale Gelelektrophoresen zur Detektion der an der Wachstumshemmung beteiligten Enzyme durchgeführt. Da für PPAR- γ Agonisten in einigen Zelllinien eine Sensitivierung gegenüber rezeptorvermittelter Apoptose nachgewiesen werden konnte, wurden das Wachstumsverhalten der genannten Zelllinien zusätzlich bei gleichzeitiger Gabe von Pioglitazon und rekombinanten TRAIL untersucht.

Kapitel 2

Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie

Acetonitril
 Acrylamid (Rotiphorese Gel)
 Acrylamid IEF
 Agar-Agar
 Agarose, low melting point
 Ampholyte pH 3-10
 Ampholyte pH 4-7
 Ampicillin
 APS (Ammoniumpersulfat)
 Borsäure
 Bromphenolblau
 BSA (bovines Serumalbumin)
 CHAPS
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 DTT
 EDTA
 Essigsäure
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Formaldehyd
 Glucose
 Glycerol
 Glycin
 H₂O Bidest
 Harnstoff
 HCl
 Iodacetamid
 LB
 Mercaptoethanol
 Methanol
 Milchpulver
 N,N'-Methylenbisacrylamid
 Natriumacetat
 Natriumcarbonat
 Natriumchlorid
 Natriumdodecylsulfat (SDS)
 Natriumfluorid
 Natriumorthovanadat
 Natrium-Pyrophosphat

Firma

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Roth, Karlsruhe, GER
 Amersham Biosciences AB, Uppsala, SW
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Serva Heidelberg, GER
 Serva Heidelberg, GER
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Serva Heidelberg, GER
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 MP Biomedicals, Eschwege, GER
 Roth, Karlsruhe, GER
 Serva Heidelberg, GER
 Roth, Karlsruhe, GER
 Merck, Darmstadt, GER
 Riedel-de Haen, Seelze, GER
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Serva Heidelberg, GER
 Merck, Darmstadt, GER
 Riedel-de Haen, Seelze, GER
 Fresenius Kabi, Bad Homburg, GER
 Roth, Karlsruhe, GER
 Merck, Darmstadt, GER
 Fluka Biochemica, Buchs, CH
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Merck, Darmstadt, GER
 Roth, Karlsruhe, GER
 Amersham Biosciences AB, Uppsala, SW
 Merck, Darmstadt, GER
 Riedel-de Haen, Seelze, GER
 Riedel-de Haen, Seelze, GER
 Roth, Karlsruhe, GER
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe, GER
Natronlauge	Merck, Darmstadt, GER
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, GER
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Propidium-Iodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Silbernitrat	Riedel-de Haen, Seelze, GER
Slim Fast	Sun Nutritional Inc.
TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Thiazolylblau	Roth, Karlsruhe, GER
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe, GER
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, GER
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton-X 100	Boehringer Mannheim, Mannheim, GER

2.2 Einwegartikel

Material

Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)
Pipettenspitzen (1 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
Eppendorfreaktionsgefäße
Zellkulturflaschen
(25cm³, 75cm³, 162cm³)
6-well Platten
12-well Platten
24-well Platten
96-well Platten
Falkonröhrchen (15ml, 50ml)

Firma

NUNC, Roskilde, DEN
Eppendorf, Hamburg, GER
Eppendorf, Hamburg, GER
Greiner Bio-one, Frickenhausen, GER

NUNC, Roskilde, DEN
NUNC, Roskilde, DEN
NUNC, Roskilde, DEN
NUNC, Roskilde, DEN
Falcon, B&D, Franklin Lanes, USA

2.3 Lösungen

Zellkultur

Kulturmedium

HCT-116 und HT-29-Zellen: McCoy's-Modified 5A-Medium
10% FCS
5% Gentamicin

Selektionsmedium

HCT-116 si pcd4: McCoy's-Modified 5A-Medium
10% FCS
5% Gentamicin
0,4% Hygromycin B (50mg/ml)

PBS (pH=7,4): 136mM NaCl
8,1mM Na₂HPO₄
2,7mM KCl
1,5mM KH₂PO₄

Einfrierlösung: 45ml FBS
5ml DMSO

Puffer für Gesamtproteinextrakt: 1ml PBS
1µl EDTA 0,5M
10µl Phosphataseinhibitor (100fach konzentriert)
20µl Na-Vanadat 100mM
10µl PMSF 100mM
25µl Na-Pyrophosphat 100mM
50µl Na-Fluorid 1M

Durchflusszytometrie

Zellzyklusanalysen

PI-Färbepuffer: 38 mM Natriumcitrat, pH7,5
200µg/ml DNase freie RNase A
12,5µg/ml Propidium Iodid
Glucose

10x TBS: 1,5M NaCl
0,1M Tris-Base pH 7,5
ad 1l Aqua bidest

TBST: 100ml 10x TBS
1ml Triton-X-100
ad 1l Aqua bidest

Trockenmilch-Blockpuffer: 7% Trockenmilch
50ml TBST

Strip-Puffer 5ml 1M Glycin
500µl 1M HCl
45ml Aqua bidest

Gelzusammensetzung (Ansatz für 2 Gele)

Sammelgel: 4ml Sammelgellösung
6µl TEMED
12µl 10% APS

Trenngel:

	10%iges Gel	12,5%iges Gel	15%iges Gel
Trenngelpuffer	2,5ml	2,5ml	2,5ml
H₂O bidest	3,67ml	3,0ml	2,0ml
Acrylamidlösung (30%/0,8%)	3,33ml	4,0ml	5,0ml
Glycerol	0,5ml	0,5ml	0,5ml
TEMED	6µl	6µl	6µl
10% APS	12µl	12µl	12µl

Tab. 2.1: Gelzusammensetzung für unterschiedliche Acrylamid-Prozentanteile

verwendete Antikörper

Erstantikörper			Zweitantikörper	
Name	Hersteller	Verdünnung	Name	Verdünnung
Aktin-HRP	Santa Cruz	1:3000	entfällt	
Caspase 10	Cell Signaling	1:1000	Anti-rabbit IgG	1:10000
Caspase 3	Santa Cruz	1:200	Anti-rabbit IgG	1:10000
cdc2p34	Cell Signaling	1:1000	Anti-rabbit IgG	1:10000
CDK4	Cell Signaling	1:2000	Anti-mouse IgG	1:10000
Cyclin D3	Cell Signaling	1:2000	Anti-mouse IgG	1:10000
Cytokeratin 19	Santa Cruz	1:500	Anti-mouse IgG	1:10000
p21 ^{cip1/waf1}	Santa Cruz	1:200	Anti-mouse IgG	1:10000
p53	Cell Signaling	1:1000	Anti-rabbit IgG	1:10000
pdcd4		1:500	Anti-rabbit IgG	1:10000
PPAR- γ H100	Santa Cruz	1:1000	Anti-rabbit IgG	1:10000
pTyrosin-HRP	Sigma	1:2000	entfällt	

Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Erst- und Zweitantikörper

Der HRP-gekoppelte anti-rabbit Zweitantikörper und der HRP-gekoppelte anti-mouse Zweitantikörper stammen von der Firma Cell Signaling (New England Biolabs, Hitchin, UK). Der HRP-gekoppelte anti-chicken Zweitantikörper wurde von Jackson ImmunolResearch Lab. (Soham, UK) geliefert. Der pdcd4-Antikörper wurde von Peptide Speciality Laboratories GmbH (Heidelberg, GER) nach unseren Angaben hergestellt.

Zweidimensionale Gelelektrophorese

Isoelektrische Fokkusierung (1. Dimension)

IEF-Acrylamid-Stammlösung:	28,4% (w/v) Acrylamid 1,6% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Gelüberschichtung:	6,5M Harnstoff
Probenüberschichtung pH 4-7:	7M Harnstoff 0,8% Ampholyte pH 4-7 0,2% Ampholyte pH 3-10
Probenüberschichtung pH 3-10:	7M Harnstoff 1% Ampholyte pH 3-10
Lysispuffer pH 4-7:	9,5M Harnstoff 2% (w/v) CHAPS 10mM DTT 4% 40%ige Ampholyte pH 4-7 1% 40%ige Ampholyte pH 3-10
Lysispuffer pH 3-10:	9,5M Harnstoff 2% (w/v) CHAPS 10mM DTT 5% 40%ige Ampholyte pH 3-10
Equilibrierungspuffer I:	0,05M Tris-HCl, pH 6,8 0,25% DTT 4% SDS 15% Glycerin

80µl 10% SDS
 40µl TEMED
 400µl 10% APS

Trenngel:

Ansatz für 2 Gele	12,5%iges Gel	15%iges Gel
1 M Tris-HCl pH 8,8	20 ml	20 ml
Acrylamidlösung (30/0,8)	20 ml	25 ml
H₂O bidest	10 ml	5 ml
10% SDS	400 µl	400 µl
TEMED	50 µl	50 µl
10% APS	500 µl	500 µl

Tab. 2.3: Trenngel-Zusammensetzung für die zweite Dimension

Silberfärbung

Fixierer: 30% Ethanol
 10% Essigsäure
 60% H₂O bidest

Na-Thiosulfatlösung: 0,2% Na-Thiosulfat
 0,1M Na-Acetatpuffer
 30% Ethanol
 70% H₂O bidest

Silbernitratlösung: 0,1% Silbernitrat
0,025% Formaldehyd in
H₂O bidest

Entwickler: 2,5% Natriumcarbonat
0,05% Formaldehyd in
H₂O bidest

Coomassie-Färbung

Fixierer: 79% H₂O bidest
20% Methanol
1% 85%ige ortho-Phosphorsäure

Färbelösung: 60% H₂O bidest
20% Methanol
20% 5fach konzentrierte koll. Coomassielösung

Waschlösung: 75% H₂O bidest
25% Methanol

Phosphoprotein-Färbung

Fixierer: 50% Methanol
10% Trichloressigsäure
40% H₂O bidest

Entfärber: 20% Acetonitril
5% 1M Natriumacetat pH4,0
75% H₂O bidest

Zweidimensionaler Western Blot

Transferpuffer 10x (Semidry-Blot): 1,92M Glycin
250mM Tris-Base pH 8,2
ad 1l Aqua bidest

Transferpuffer 1x (Semidry-Blot): 100ml 10x Transferpuffer
200ml Methanol
ad 1l Aqua bidest

Molekularbiologische Methoden

LB-Agar-Selektionsplatten: 10g Bactotryptone
5g Hefeextrakt
10g NaCl
15g Bactoagar
100µg/ml Ampicillin
ad 1l Aqua bidest

LB-Medium: 10g Bactotrypton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
ad 1l Aqua bidest
pH 7,5

TBE-Puffer: Rotiphorese 10x TBE (Roth, Karlsruhe, GER)

Agarose-Gel: 0,5g Agarose in 50ml 1x TBE
1,5min in Mikrowelle kochen, abkühlen
+ 8µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

Kapitel 3

Methoden

3.1 Kultivierung der Zellen

3.1.1 Zelllinien

3.1.1.1 HCT-116 Zelllinie

Hierbei handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane Kolonkarzinomzelllinie eines erwachsenen Mannes. Die Kultur erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben.

3.1.1.2 HT-29 Zelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärent wachsende, humane Kolonkarzinomzellen. Sie wurden 1964 aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau mit Kolon-Adenokarzinom isoliert. Der Primärtumor entsprach einem gut differenzierten (Grad I) Tumor. Die Kultur erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben.

3.1.2 Kulturbedingungen

Die Kultur der Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Inkubatoren (Heraeus, Hanau, GER). Als Standardmedium wurde sowohl für die HCT-116-, als auch für die HT-29-Zelllinie McCoy's 5A Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 2,5% Gentamycin (PAA Laboratories, Linz, CH) und 10% fötalem Kälberserum (PAA, Pasching, GER) versetzt. Das frisch angesetzte Nährmedium wurde maximal 21 Tage bei 4°C aufbewahrt. Für die Kultur der pcd4-, bzw. Mock-transfizierten HCT-116 Kolonkarzinom Zellen wurde dem Standardmedium zusätzlich 800µg/ml Gentamicin hinzugefügt. Die Handhabung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus, Hanau, GER), mit sterilen Lösungen und sterilem Arbeitsmaterial. Als Kulturgefäße wurden Einweg-Zellkulturflaschen verwendet.

3.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Um jederzeit auf ausreichend Zellen zurückgreifen zu können, bzw. um sie über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen können so über Jahre konserviert werden, ohne dass ihre Lebensfähigkeit beeinträchtigt wird. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.5.1 beschrieben mit Trypsin gelöst und durch 3minütiges Zentrifugieren bei 1200rpm ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde dann in FCS mit 5% DMSO resuspendiert und jeweils 1ml hiervon in Einfrier Röhrchen gefüllt. Der hohe Serumgehalt sorgt dafür, dass die Proteinkonzentration intra- und extrazellulär gleich bleibt, auch wenn DMSO die Membran permeabel macht. Durch das lipophile DMSO wird die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche die Zellmembran zerstören würden. Das Einfrieren der Röhrchen erfolgte in einem speziellen Einfrierbehältnis (Stratacooler, Stratagen, La Jolla, USA), das das langsame, kontinuierliche Abkühlen der Zellen um 1°C pro Minute bis -80°C gewährleistet. Die Langzeitaufbewahrung der Zellen erfolgte anschließend bei -180°C in flüssigem Stickstoff.

3.1.4 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und ca. 2min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei Temperaturen über 10°C zelltoxisch ist, musste die Zellsuspension möglichst schnell mit frischem Medium verdünnt und in eine Zellkulturflasche überführt werden. Um die abgestorbenen Zellen zu entfernen wurde das Medium nach 24h gewechselt. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben.

3.1.5 Passagieren der Zellen

Um eine möglichst konstante, semikonfluente Zelldichte über die Zeit zu gewährleisten, wurden die Zellen abhängig von der Zelllinie 2-3mal in der Woche bei ca. 80%iger Konfluenz subkultiviert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium steril abgesaugt und die

Zellen mit 2-5ml Trypsin (PAA, Pasching, GER) ca. 2min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Flasche suspendiert, um Zellklumpen zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15ml Falconröhrchen überführt und die Trypsinsuspension zum Schutz der Zellen mit Kulturmedium verdünnt. Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte in einer Tischzentrifuge (Herolab, Wiesloch, GER) für 3min bei 1200rpm. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet je nach gewünschter Dichte mit Standardmedium 1:6 – 1:10 resuspendiert und ca. 1ml davon in eine mit Kulturmedium gefüllte Zellkulturflasche gegeben.

Bei Experimenten, die eine gleichmäßige Zelldichte in verschiedenen Gefäßen voraussetzten, wurden zunächst 50ml Stamm-Zellsuspension hergestellt, aus welcher dann die Gefäße mit den gleichen Volumina befüllt wurden. Für die unterschiedlichen Kulturgefäße wurden folgende Volumina verwendet:

24-well Platte	1ml
12-well Platte	1,5ml
6-well Platte	2ml
10er Petrischale	10ml
kleine Flasche	7ml
mittlere Flasche	13ml
große Flasche	25ml

3.2 Proliferationsanalysen

Zur Bestimmung des Zellwachstums kamen zwei unterschiedliche Techniken zum Einsatz. Nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Medikamenten wurde die Anzahl der überlebenden Zellen mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt (siehe 3.2.1). Die Untersuchung der während der Inkubation abgestorbenen Zellen erfolgte indirekt durch Detektion der Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellkulturmedium mittels LDH-Assay (siehe 3.2.2).

3.2.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay dient der Bestimmung des Zellwachstums bei Einwirkung unterschiedlicher Noxen.

MTT - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid - ist ein gelbes Tetrazoliumsalz welches durch mitochondriale Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen in blau-violette Formazan-Kristalle überführt wird. Je mehr Mitochondrien vorhanden sind, desto mehr MTT wird zu Formazan umgewandelt. Auf diese Weise ist eine schnelle quantitative Bestimmung der Anzahl und der Aktivität verschiedener Zellen möglich. Außerdem lässt sich so eine orientierende Aussage über den Effekt von Noxen auf die Zellen machen.

Zur Bestimmung der Proliferationsbeeinflussung der verwendeten Zelllinien, wurden die Zellen über 24h, 48h und 72h mit unterschiedlichen Medikamenten in 24 Well-Platten inkubiert. Anschließend wurden zur Bestimmung der Vitalität der Zellen 20µl MTT-Lösung/Well zu den Zellen gegeben. Die MTT-Lösung wurde aus 5mg/ml MTT (Sigma, St. Luis, USA) in PBS angesetzt.

Nach zwei Stunden wurden die Zellüberstände abgesaugt. Da die Formazan-Kristalle schlecht wasserlöslich sind, wurden sie vor der photometrischen Bestimmung für 20min in 200µl DMSO/Well gelöst. Die Bestimmung erfolgte photometrisch in 96 Loch-Platten bei 570nm. Da die Reduktion von MTT nur in metabolisch aktiven Zellen stattfinden kann, ist die im Photometer gemessene Absorption proportional zur Vitalität der Zellen. Die Ergebnisse werden sowohl als gemessene Extinktion, als auch durch den prozentualen Anteil vitaler behandelter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt, welche sich wie folgt berechnen lässt:

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Extinktion (Probe)}}{\text{Extinktion (Kontrolle)}} \times 100$$

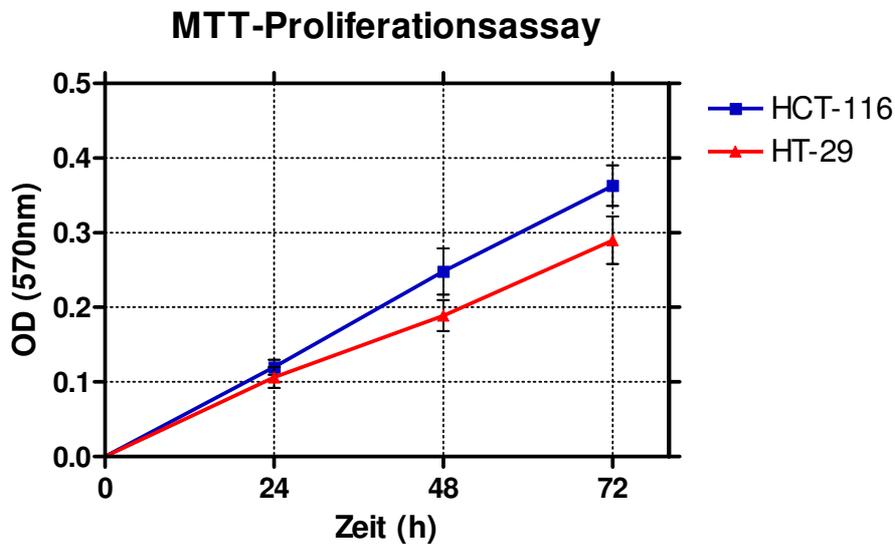


Abb. 3.1: Bestimmung des Wachstumsverhaltens von HCT-116 und HT-29 Zellen mittels MTT-Assay. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD

3.2.2 LDH-Assay

Die Lactatdehydrogenase ist ein in vielen Geweben vorkommendes Enzym, welches die Reaktion von Pyruvat zu Lactat katalysiert. Beim Untergang von Zellen wird die LDH in das Kulturmedium abgegeben und lässt auf diese Weise Rückschlüsse auf das Ausmaß des Zelluntergangs zu. Die Aktivität der LDH wurde mit Hilfe des Xyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, USA) ermittelt. In einer 96-well Platte wurden hierfür 50µl des Zellkulturüberstandes mit 50µl Substratlösung vermischt und 30min lichtgeschützt inkubiert. Durch Zugabe von 50µl Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Absorption bei 570nm gemessen. Dabei ist die Höhe der Absorption proportional zur LDH-Freisetzung aus den Zellen und damit der Zellschädigung. Die Ergebnisse werden in Bezug zur unbehandelten Kulturreihe in Prozent angegeben.

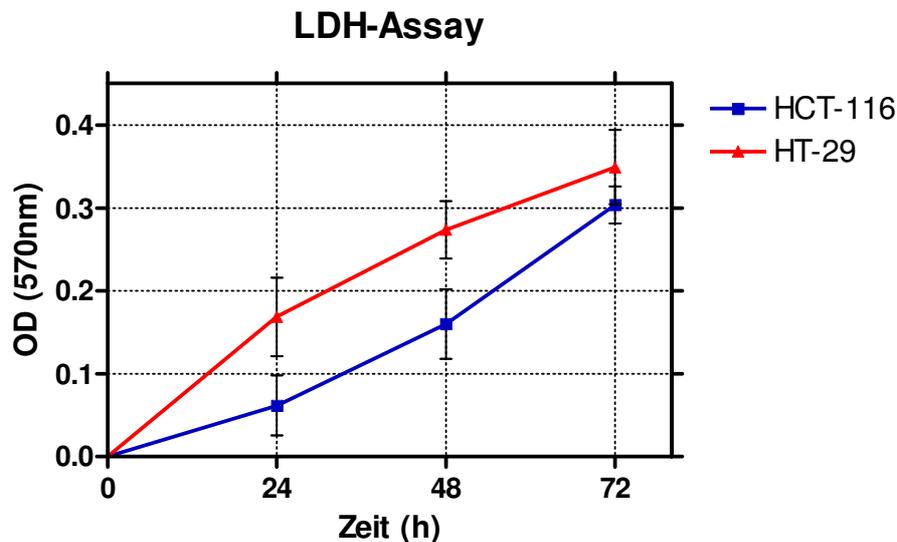


Abb. 3.2: Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität in den Mediumüberständen von HCT-116 und HT-29 Zellen mittels LDH-Assay. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen +/- SD

3.3 Wachstumsanalysen in Anwesenheit des PPAR- γ Antagonisten GW9662

Um die Mechanismen zu ergründen, über die Pioglitazon seinen antiproliferativen Effekt auf humane Kolonkarzinomzellen ausübt, wurden die Zellkulturen mit spezifischen Antagonisten behandelt, die die entsprechenden Funktionen hemmen. Hierfür wurden die Zellkulturen –wenn nicht anderweitig beschrieben- 24h Stunden vor Versuchsbeginn ausplattiert. Je nach Dauer des Versuchs geschah dies mit 40-60%iger Konfluenz. Unmittelbar vor dem Start des Experiments wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, enthielt das Medium der Kontrollzellreihe einen DMSO-Zusatz in der entsprechenden Konzentration der Versuchsreihe.

Mit Hilfe des PPAR- γ - Antagonisten GW9662 (Alexis Biochemicals, San Diego, USA) wurde untersucht, ob die durch Pioglitazon verursachten Veränderungen auf Wachstum und

Proteinexpression PPAR- γ vermittelt oder von diesem Transkriptionsfaktor unabhängig sind. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 2 μ M GW9662 vorinkubiert. Nach Zugabe von 40 μ M Pioglitazon erfolgte die Analyse der Zellproliferation mit Hilfe von MTT- und LDH-Assay. Für Analysen mittels Western-Blot wurden Zelllysate hergestellt.

3.4 Durchflusszytometrische Analysen

3.4.1 Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Propidiumiodid (PI) ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff. Wird PI im Überschuss zu der Probe gegeben, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt der Zelle und der Fluoreszenzintensität. Durch Messung im Fluoreszenzkanal kann auf den DNA Gehalt der Zelle und somit auf die Verteilung im Zellzyklus geschlossen werden. Voraussetzung hierbei ist die Beseitigung der zellulären RNA, da PI auch diese anfärbt. Die Zellzyklus-Analysen wurden mit einem Durchflusszytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA) nach allgemein geltendem Standard durchgeführt und die erhaltenen Daten mit der Software CellQuest ausgewertet.

3.4.1.1 Ernten und Fixieren der Zellen

Für die Zellzyklus-Untersuchungen wurden HCT-116 Zellen über 24, 48 und 72 Stunden mit 40 μ M Pioglitazon inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt, und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber in ein 10ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden einmal mit 1ml PBS gewaschen und bei 2500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Zellen durch tropfenweises Zugeben von eiskaltem 70%igem Ethanol bei ständigem Vortexen fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Probenröhrchen mit Parafilm verschlossen und vor der Messung über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

3.4.1.2 RNase Verdau und Propidiumiodid-Färbung

Die durch Ethanol fixierten und permeabilisierten Zellen wurden bei 4°C eine Nacht gelagert und dann bei 1400rpm 5min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit 2ml PBS resuspendiert und nochmals bei 1400U/min zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände erfolgte die RNase-Behandlung durch Zugabe von DNase-freier RNase mit einer Endkonzentration von 1µg/ml (Roche, Basel, CH). Nach erneutem Vortexen wurden die Proben bei 37°C 30min inkubiert. Anschließend erfolgte die Propidiumiodid-Färbung durch Zugabe von 1ml Waschpuffer und 50µg/ml Propidiumiodid. Die Proben wurden 30min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gemessen.

3.4.1.3 Messung der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometer

Die Messung der Proben wurde im FL-2-Kanal (detektierter Wellenlängenbereich: 564-606 nm, Rot) des FACS vorgenommen. Die Parameter wurden in einem Akquisitions-Fenster, das FL-2-W (engl. width) gegen FL-2-A (engl. area) zeigte, so eingestellt, dass die Zellansammlung, die der G1-Phase entspricht, bei beiden Achsen etwa bei dem Wert von 30 Fluoreszenz-Einheiten zu liegen kam (siehe Abbildung 3.3). Dieses Vorgehen führt dazu, dass die Zellansammlung, die die Zellen in der G2/M-Phase umfasst, im Bereich des FL-2-A-Werts von 60, also der doppelten Fluoreszenz-Intensität, zu finden ist, da diese Fluoreszenz dem doppelten Chromosomensatz entspricht. Bei diesen Messungen wurden stets 20.000 Zellen aufgenommen. Nach der Messung wurden die Daten in einem Diagramm dargestellt und ausgewertet.

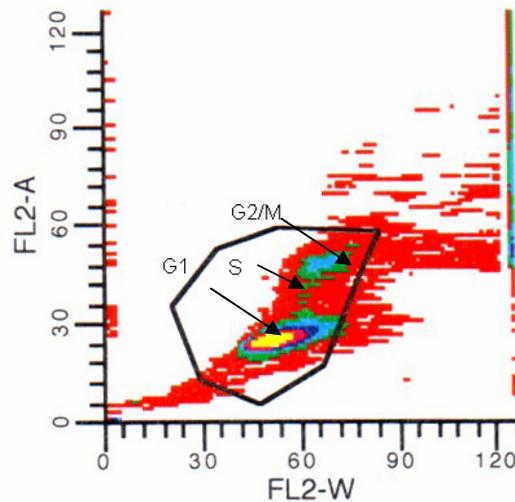


Abb. 3.3: Beispiel einer durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellzyklusphasen von HCT-116 Zellen

3.4.2 Bestimmung der spezifischen Apoptose

Für die Bestimmung der spezifischen Apoptose wurden HCT-116 Zellen über 24, 48 und 72 Stunden mit 40 μ M Pioglitazon in 10cm Petrischalen inkubiert. Anschließend wurden die subkonfluenten Zellen inklusive ihrer Überstände geerntet und 2min bei 2500rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit 1ml PBS gewaschen und erneut 2min bei 2500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und in einer Lösung bestehend aus PBS (pH 7,4) 1mM Glukose und 2 μ g/ml Propidiumiodid resuspendiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACScan-Durchflusszytometer und der Software CellQuest (Becton-Dickinson).

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Ernten der Zellen und Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Für die Analyse von Proteinen im Western Blot oder mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt. Hierzu wurden zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellkulturen mit einem sterilen Zellschaber aus der Kulturschale abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Jedem Waschschrift folgte ein Zentrifugieren für 3min bei 1200rpm. Zuletzt wurde das so gewonnene Zellpellet in 100-500µl Extraktpuffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen, und somit die Freisetzung intrazellulärer Proteine erfolgte mit Hilfe eines Labsonic Ultraschallgerätes (B. Braun, Melsungen, GER) mit 6 x 0,5sec.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde der BioRad-Protein-Assay (BioRad, München, GER) angewendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Protein-Assay-Lösung 1:5 verdünnt, 200µl davon wurden in einer 96 Lochplatte mit 1µl der Proteinprobe gemischt und die Absorption bei 570nm im Photometer (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories Limited, West Sussex, GB) gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BSA-Standard (Sigma, St. Luis, USA) in den Konzentrationen 1µg/µl, 2µg/µl und 4µg/µl zur Erstellung einer Eichkurve mitgemessen.

3.5.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine nicht nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, sondern zusätzlich in einem vorgeschalteten Schritt nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Dieses Verfahren ermöglicht eine genaue und sichere

Auftrennung von Zelllysaten in einzelne Proteinpunkte. Im folgenden Abschnitt wird zuerst die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt, anschließend die nach ihrem Molekulargewicht beschrieben.

3.5.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Während der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) werden die Proteine aufgrund ihrer Nettoladung aufgetrennt. Dabei wandern die Proteine im elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten solange, bis ihre Nettoladung null entspricht. Dieser Punkt wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet und ist für jedes Protein charakteristisch.

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde das V20-CAP Capillary Gel Elektrophorese System von SCIE-PLAS (Southam, GB) verwendet. Die IEF erfolgt in Glaskapillaren von 16cm Länge und einem inneren Durchmesser von 0,3cm. Die Auftrennung der Proteine richtete sich nach dem pH-Gradienten der Röhrengel und erfolgte entweder in einem pH-Bereich zwischen 4 und 7, bzw. zwischen 3 und 10. Nach dem Auftragen der Proben auf die Kapillargele wurden diese mit 20µl Probenüberschichtung überschichtet und mit 0,02M Natronlauge als Kathodenpuffer bedeckt. Der Anodenpuffer bestand aus 0,01M ortho-Phosphorsäure.

Die Fokussierung erfolgte zunächst 30min bei 200V, dann für 18,5h bei 500V, 1h bei 800V und zuletzt 1,5h bei 1000V jeweils bei 4°C. Zur Kontrolle der isoelektrischen Auftrennung wurden 5µl IEF-Standard pI 4,45 – 9,6 (BioRad, Hercules, USA) mit der Probe mitgeführt. Nach der Fokussierung wurden die Gele mit einer 10ml Einwegspritze aus den Kapillaren gelöst und jeweils 20min in Equilibrierungspuffer I und II bei 37°C inkubiert.

3.5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der isoelektrischen Fokussierung erfolgte in der 2. Dimension die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem V20-CDC Vertical Gel Elektrophorese System von SCIE-PLAS (Southam, UK). Dazu wurde das Kapillargel der 1. Dimension auf ein 16,5cm x 17cm x 1mm großes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch 0,5%ige

Agarose fixiert. Um den Proteinen die korrekte Größe zuordnen zu können, wurde ein Prestained Protein Marker (New England BioLabs, Beverly, USA) mitgeführt. Die Gelelektrophorese verlief 30min mit 30mA/Gel, 30min mit 45mA/Gel und ca. 2h mit 60mA/Gel.

3.5.3.3 Silberfärbung

Die Silbernitratfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von Proteinen. Bei dieser Methode bilden die positiv geladenen Silberionen Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten von Proteinen. Durch die Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber mittels Formaldehyd und Natriumcarbonat entsteht die charakteristische Schwarz- bzw. Braunfärbung.

Nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese oder Western-Blot wurden die Gele mit Fixierer behandelt und über Nacht in 0,2% Na-Thiosulfatlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele dreimal für jeweils 10min mit Aqua bidest gewaschen und für weitere 25min mit 0,1% Silbernitratlösung behandelt. Vor dem Entwickeln wurden die Gele nochmals ca. 30s mit Aqua bidest und zweimal mit 50ml Entwickler gewaschen. Durch die Zugabe von 100ml Entwicklerlösung wurde das elementare Silber ausgefällt und die Reaktion bei der gewünschten Braunfärbung der Gele mit 10ml 10%iger Essigsäure gestoppt. Alle Lösungen wurden frisch angesetzt, die Trocknung der Gele erfolgte nach Behandlung mit Gelfixlösung in einem Bio-Rad Gel-Dryer Model 543 (BioRad, Hercules, USA) bei 60°C für 1,5h.

3.5.3.4 Färbung mit kolloidalem Coomassie Blau

Die Coomassie-Färbung ist eine reversible, nicht-denaturierende Färbung von Proteinen mit einer Sensitivität von <30ng. Diese Färbung bietet sich vor allem an für die Detektion von Proteinen, die anschließend per MALDI-TOF MS Fingerprint-Analyse identifiziert werden sollen. Hierzu wurden die Gele nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese wie unter 3.5.3.1 und 3.5.3.2 beschrieben zunächst 60min in 200ml Fixierlösung inkubiert. Die

Färbung der Proteine erfolgte mit kolloidaler Coomassie-Färbung Roti-Blue® (Roth, Karlsruhe, GER) über Nacht. Um ausgefallene Farbstoffkomplexe von den Gelen zu entfernen, wurden diese in eine saubere Schale überführt und 5min mit Waschlösung behandelt. Die gefärbten Proteinspots konnten so auf einem Leuchttisch (Rex, Erlangen, GER) untersucht und für den In-Gel-Verdau mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten werden.

3.5.3.5 Phosphoprotein-Färbung

Die Phosphoprotein-Färbung ist eine Methode zur selektiven Färbung von Phosphoproteinen in Polyacrylamidgelen. Dabei werden Phosphatreste an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Sensitivität der Phosphoprotein-Färbung ist abhängig vom Phosphorylierungsgrad des zu untersuchenden Proteins und liegt bei 1-16ng. Aus diesem Grund ist sie vor allem für die Untersuchung von Signaltransduktionswegen und posttranslationaler Modifikation geeignet.

Die Gele wurden nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese oder Western-Blot für 60min und über Nacht mit 125ml Fixierer behandelt, um das SDS auszuwaschen. Anschließend folgten 4 Waschschrirte a 15min mit 250ml Aqua bidest. Für die Phosphoprotein-Färbung wurden die Gele mit 125ml Pro-Q-Diamond® Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen, Paisley, UK) für ca. 2h im Dunkeln inkubiert. Um die unspezifischen Signale zu minimieren, wurden die Gele 3 x 30min mit Entfärbelösung im Dunkeln behandelt und anschließend noch einmal kurz mit 250ml Aqua bidest gewaschen. Die Detektion des Fluoreszenz-Signals erfolgte bei einer Wellenlänge von 330nm mit einem Fluoreszenztransilluminator (MWG-Biotech, Mendenhall, USA).

3.5.3.6 In-Gel-Verdau von Proteinen

Nach der Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blue (Roth, Karlsruhe, GER) wurden Proteinspots, die mit Hilfe der MALDI-TOF Peptid-Fingerprint-Analyse identifiziert werden sollten, mit einem Skalpell aus den 2D-Gelen ausgeschnitten und in 200µl PCR-

Cups überführt. Um Aggregationen und intermolekulare Interaktionen auszuschließen, wurden die Proteine im Folgenden reduziert und alkyliert. Zunächst wurden die Gelstückchen mit 100µl Aqua bidest und anschließend mit 100µl 25mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) für jeweils 30min bei 37°C gewaschen. Anschließend wurden die Proben 2 x 30min mit 100µl 25mM NH_4HCO_3 in 50%igem Acetonitril bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Vorgang noch einmal mit 100µl 100%igem Acetonitril für 10min wiederholt bei ebenfalls 37°C. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurden die Gelstückchen für 5min an der Luft getrocknet. Die Reduktion der Proteinproben erfolgte durch Überschichtung der Gelstückchen mit 10mM DTT in 25mM NH_4HCO_3 für 1h bei 56°C. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt, der Überstand wurde erneut verworfen. Anschließend wurden die Proteinproben in den Gelstückchen zunächst mit 25mM Iodacetamid in 25mM NH_4HCO_3 für 30min, dann mit 10mM DTT in 25mM NH_4HCO_3 für 10min jeweils bei 37°C und im Dunkeln inkubiert. Darauf folgte ein erneutes Waschen mit 100µl 50%igem Acetonitril in 25mM NH_4HCO_3 für 30min, und ein Schrumpfen der Gelstückchen mit 100µl 100% Acetonitril jeweils bei 37°C. Vor dem tryptischen Verdau wurden die Proteinproben erneut für 5min bei RT getrocknet.

Der eigentliche In-Gel-Verdau erfolgte mit 125ng eiskaltem Trypsin (Promega V5111, Seq. Grade Modified) in 200µl NH_4HCO_3 . Hierzu wurden die Proteinproben zunächst für 15min auf Eis gestellt und dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Trypsinlösung wurde verworfen und durch 20µl des gleichen Puffers ohne Trypsin ersetzt. Durch ein Loch im Boden des 200µl PCR-Cups konnte der Überstand durch Zentrifugieren bei 2500rpm für 2min in einem 1,5ml Eppendorf-Cup aufgefangen werden. Zur weiteren Extraktion der Proteinfragmente aus den Gelstückchen wurden die Proben abwechselnd mit 20µl 1%ige Trifluoressigsäure für 30min bei 37°C behandelt und anschließend bei 2500rpm für 2min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, der Überstand wurde gepoolt. Zuletzt wurden die extrahierten Proteine in einer Vakuumzentrifuge ca. 2h eingetrocknet und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.5.3.7 MALDI-TOF MS Peptid-Fingerprint-Analyse

Die durch den tryptischen In-Gel-Verdau entstandenen Proteinfragmente wurden mit Hilfe der MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry) Analyse bestimmt. Bei dieser Methode werden die Peptide in Kristalle von UV-absorbierenden Molekülen eingebaut, wobei sie durch Protonentransfer positiv aufgeladen werden. Die Peptid/Kristall-Komplexe (Matrix) werden dann im Vakuum mit einem UV-Laser bestrahlt, wodurch die Peptidionen freigesetzt werden. Dieses Gas von positiv geladenen Proteinionen wird durch ein elektrisches Feld in Richtung eines Detektors beschleunigt, welcher die Zeit misst, in der die Ionen die Strecke zwischen der Matrix und dem Detektor zurücklegen (Time-Of-Flight). Die Geschwindigkeit, die ein Peptidion für diese Strecke benötigt ist proportional zu seiner Masse. Die Flugzeit der Peptidionen kann somit in die entsprechende Masse des Peptids umgerechnet und graphisch dargestellt werden. Die gemessenen Flugzeiten aller Peptidfragmente eines Proteins ergibt den so genannten „peptide fingerprint“. Zur Identifizierung des Proteins kann dieser „Fingerabdruck“ mit öffentlich zugänglichen Datenbanken abgeglichen werden, in denen potentielle Genprodukte sequentierter Genome virtuell tryptisch verdaut und die Massen der möglichen Peptidfragmente berechnet werden.

Die MALDI-TOF MS Peptid-Fingerprint-Analyse wurde in Kooperation mit den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried, GER) und Nadicom (Marburg, GER) durchgeführt.

Zur Auswertung des ermittelten „peptide fingerprint“ wurden die im Internet zugängliche Software von Matrixscience Mascot (www.matrixscience.com) angewandt. Als signifikante Übereinstimmung wurde dabei ein Proteinscore >76 gewählt.

3.5.4 Western-Blot

Im Western-Blot Verfahren werden Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und so dem Einsatz von spezifischen Antikörpern zugänglich. Der Western-Blot ermöglicht so eine hohe Genauigkeit bei der Analyse von Proteinexpression in Zellen und Zellkulturüberständen.

3.5.4.1 Auftrennung der Proteine und Blotting

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einem EC-Mini vertical Gel System (BioRad, Hercules, USA). Je nach zu untersuchendem Protein wurden zwischen 10µg und 20µg Protein pro Spur aufgetragen. Dabei wurden die benötigten Proteinextraktvolumina auf 12µl mit Aqua bidest aufgefüllt, mit 4µl 4xSDS-Laufpuffer sowie 1,6µl 1M DTT vermischt und 5min bei 100°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Um später die korrekte Größe des zu untersuchenden Proteins nachvollziehen zu können, wurde bei jedem Gel ein Prestained Protein Marker (New England BioLabs, Beverly, USA) als Größenstandard mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei 25mA/Gel bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Als Laufpuffer wurden 100ml des zehnfach konzentrierten SDS-Laufpuffers auf 1l mit Aqua bidest aufgefüllt.

Das Blotten der Gele erfolgte anschließend in einer BioRad Mini Trans-Blot ® Cell (BioRad, Hercules, USA). Als Blotting-Puffer wurden 100ml zehnfach konzentrierter Towbin buffer (Serva, Heidelberg, GER) mit 200ml Methanol vermischt und auf 1l mit Aqua bidest aufgefüllt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Nitrocellulosemembranen von 0,2µm (Optitran BA-S 83 Schleicher und Schuell, Dassel, GER) bzw. 0,45µm Porengröße (Optitran BA-S 85, Schleicher und Schuell, Dassel, GER) verwendet. Der Transfer erfolgt bei 300mA für ca. 1h.

Zweidimensionale Polyacrylamid-Gele wurden aufgrund ihrer Größe mit einer Trans-Blot® SD Semidry-Transfer Cell (BioRad, Hercules, USA) auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Geblottet wurde hier 1h bei 1,5 mA/cm².

3.5.4.2 Ponceau S-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine von der Polyacrylamidmatrix auf die Nitrocellulosemembranen wurden die Membranen für 5min in Ponceau S (Sigma, St. Louis, USA) eingelegt. Die auf diese Weise reversibel angefärbten Proteinbanden konnten so nach mehrmaligem Waschen der Membranen mit Aqua bidest zum Abgleich der aufgetragenen Proteinkonzentrationen herangezogen werden.

3.5.4.3 Detektion

Bevor die Membranen mit spezifischen Antikörpern behandelt werden konnten, mussten unspezifische Bindungsstellen der Proteine und der Membranen blockiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die Membranen 1 h bei Raumtemperatur in 20ml Trockenmilch-Blockpuffer inkubiert. Danach wurden die Membranen über Nacht bei 4°C auf einem Kippschüttler mit verdünntem Erstantikörper behandelt. Die Verdünnung des Erstantikörpers richtete sich dabei nach den jeweiligen Herstellerangaben und erfolgte ebenfalls mit Trockenmilch-Blockpuffer. Die verwendeten Erstantikörper sowie deren Verdünnung sind der Tab. 2.2 (Seite 22) zu entnehmen.

Bevor die Membranen mit dem Zweitantikörper behandelt werden konnten, mussten sie 3x 10min mit TBST gewaschen werden, um den ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper war abhängig vom verwendeten Erstantikörper und erfolgte 1h bei Raumtemperatur. Verwendet wurde ein Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in Trockenmilch-Blockpuffer. Vor Zugabe des Peroxidase-Substrats wurden die Membranen erneut 3x 10min mit TBST gewaschen und danach kurz an der Luft getrocknet. Als Substrat für die HRP kamen drei unterschiedliche Systeme zur Anwendung. Je nach Stärke des Signals wurde der ECL

Advanced Western Blotting Detection Kit, ECL Western Blotting Detection Reagents oder ECL Plus Detection Reagents (alle Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) verwendet. Die Membranen wurden für 1-5min mit der ECL-Detection Lösung inkubiert und das entstandene Chemilumineszenzsignal mit einem Hyperfilm™ ECL Röntgenfilm (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) aufgenommen. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einer automatischen Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA).

Nach Detektion der entsprechenden Proteine wurde zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinkonzentrationen die Membranen 1h bei RT mit HRP-konjugiertem Aktin-Antikörper inkubiert und das Signal wie oben beschrieben erfasst.

3.5.5 Immunpräzipitation

Aus Zellen einer 10cm Petrischale wurde wie unter 3.5.1 beschrieben ein Gesamtproteinextrakt hergestellt und die darin enthaltene Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.5.2). Anschließend wurden 500-1000µg Protein in ein 1,5ml Eppendorf-Cup überführt. Zu vergleichende Proteinlysate wurden mit PBS auf das gleiche Volumen aufgefüllt und 1h bei 4°C mit 5µg des Erstantikörpers inkubiert. Zur Immunpräzipitation der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurde jede Probe mit 40µl Protein-G-Agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) versetzt und über Nacht auf einem REAX-2 Über-Kopf-Rotator (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, GER) inkubiert. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurden die Proben anschließend 1min bei 2500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500µl PBS. Auch hier wurde jeweils 1min bei 2500rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurde das entstandene Pellet in 40µl zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffer resuspendiert. Durch fünfminütiges Erhitzen bei 90°C wurden die präzipitierten Proteine von der Protein-G-Agarose getrennt und so der weiteren Analyse zugänglich.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Spin Column Purification Kit (Qiagen, Hilden, GER). Hierzu wurden Zellen einer 10cm Petrischale bei ca. 70%iger Konfluenz nach Entfernen des Kulturmediums durch Zugabe von 350µl RLT-Gemisch lysiert. Um möglichst viel Lysat zu gewinnen wurden Zellreste mit einem sterilen Zellschaber aus der Kulturschale abgelöst. Die Suspension wurde abpipettiert und mittels QIA-Shredder-Säulen homogenisiert. Die weitere Isolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Lagerung der RNA-Extrakte erfolgte bei -80°C. Zur Konzentrationsbestimmung des entstandenen RNA-Eluats wurden 5µl hiervon mit 495µl Aqua bidest verdünnt und die Absorption mit einem Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator (LKB Biochrom, Cambridge, UK) bei 260nm gemessen. Die Gesamt-RNA-Konzentration errechnet sich aus der Formel:

$$c[\text{RNA}] \text{ (in ng/}\mu\text{l)} = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.6.2 RT-PCR und PCR

Zur Umschreibung der RNA in DNA mittels RT-PCR und anschließender Amplifikation mittels PCR wurde der OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, GER) verwendet. In 500µl MicroAmp® Reaction Tubes (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde der Reaktionsansatz zur DNA-Synthese angesetzt. Dabei wurde jegliche Verunreinigung der Lösungen minimiert, um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Sowohl die Proben, als auch die Lösungen wurden auf Eis behandelt. Die verwendeten Volumina richteten sich nach den Angaben des Herstellers und betragen bezogen auf ein Endvolumen von 50µl, die für die Synthese der pcd4 cDNA verwendeten Primer sind in Abb. 3.4 dargestellt:

RNase freies Wasser:	ad 50µl
5x Qiagen Onestep RT-PCR Puffer	10µl
dNTP Mix	2µl
Primer A (50nmol/µl)	0,6µl
Primer B (50nmol/µl)	0,6µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix	2µl
RNase-Inhibitor	0,2µl
(ggf. 5x Q-Solution)	10µl

Primer	Sequenz 5'-3'
hPDCD4-Sense	atg gat gta gaa aat gag cag ata ctg
hPDCD4-Antisense	tca gta gct ctc tgg ttt aag acg acc

Abb. 3.4: Verwendete Primer für die Synthese der cDNA von pdc4

Die reverse Transkription und die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Techne, Cambridge,UK) nach folgendem Programm:

Reverse Transkription	30min bei 50°C
Initial PCR Aktivierungsschritt	15min bei 95°C
3-step-PCR:	
Denaturierung	30sec bei 94°C
Annealing	30sec bei 59°C
Elongation	1min bei 72°C
Anzahl der Zyklen	35
Final extension	10min bei 72°C

Zur Überprüfung der PCR wurden 5-10µl PCR-Produkt mit Auftragspuffer versetzt und in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.6.3 Transformation und Selektionierung

Bei der Transformation werden freie Plasmid-Moleküle durch Hitzeschock in kompetente Bakterien eingeschleust. Anschließend werden die Bakterien mittels Plasmid-induzierter Antibiotikaresistenz auf die Anwesenheit des transformierten Plasmids hin selektioniert.

Für den Einbau der pcd4-DNA in Plasmid-DNA mit anschließender Transformation in kompetente E. Coli wurde der pcDNA 3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet.

Die Taq Polymerase besitzt eine Template-unabhängige terminale Transferaseaktivität, welche am 3'-Ende ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das PCR-Produkt anfügt. Für diese 3'-A-überhängenden Enden stellen TOPO®-Vektoren kompatible 3'-Desoxythymidin-Überhänge bereit. Dadurch kann das PCR-Produkt in den Vektor integriert werden.



Abb. 3.5: Schematische Darstellung des PCR-Produktes im TOPO®-Vektor.

Für die TOPO®-Reaktion wurden 4µl des PCR-Produkts mit der Salzlösung und dem TOPO®-Vektor vermischt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Zugabe von 2µl des TOPO®-Reaktionsgemischs zu chemisch kompetente E. coli (One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli, Invitrogen, Paisley, UK) mit anschließender Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 30 Sekunden. 50µl der transformierten Kulturen wurden auf angewärmte LB-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen wurden acht mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und erneut über Nacht in 2ml LB-Medium mit

einem Ampicillinzusatz von 100µg/ml kultiviert. Die Inkubation erfolgte auf einem Horizontalschüttler (Ceromat®, B. Braun, Melsungen, GER) bei ca. 200Upm und 37°C.

3.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus den transformierten E. coli erfolgte mit Hilfe des Plasmid DNA Purification Kit Nucleo Spin® Plasmid (Machery-Nagel, Düren, GER). Hierbei wurden 2ml des Kulturvolumens lysiert und die Plasmid-DNA nach den entsprechenden Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Konzentrationsbestimmung des entstandenen DNA-Eluats wurden 5µl hiervon mit 495µl Aqua bidest verdünnt und die Absorption mit einem Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator (LKB Biochrom, Cambridge, UK) bei 260nm gemessen. Die Gesamt-DNA-Konzentration errechnet sich aus der Formel:

$$c[\text{DNA}] \text{ (in ng/}\mu\text{l)} = 50 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.6.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Isolierung der pdcd4-DNA aus der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Hierbei handelt es sich um besondere DNasen, die an spezifische Erkennungssequenzen binden. Diese Erkennungssequenzen sind in der Regel vier bis acht Nukleotidpaare lang und haben Palindromstruktur. Durch Bindung der Restriktionsendonucleasen wird die DNA an diesen Erkennungssequenzen gespalten. Die auf diese Weise aus den Plasmiden freigesetzte pdcd4-DNA wurde in 1%igen Agarosegelen elektrophoretisch von anderen beim Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmenten getrennt und mittels eines UV-Transilluminators (Vilbert Lourmat, Marne la Vallee, FRA) sichtbar gemacht.

Für den restriktiven Verdau des TOPO-pdcd4-Plasmids wurden die Restriktionsendonukleasen Xho I und BamH I (beide New England BioLabs, Beverly, USA) gewählt. Diese beiden Enzyme eigneten sich vor allem deswegen für den Verdau, da sie keine Erkennungssequenzen innerhalb der pdcd4-DNA besitzen (siehe Abb 3.6).

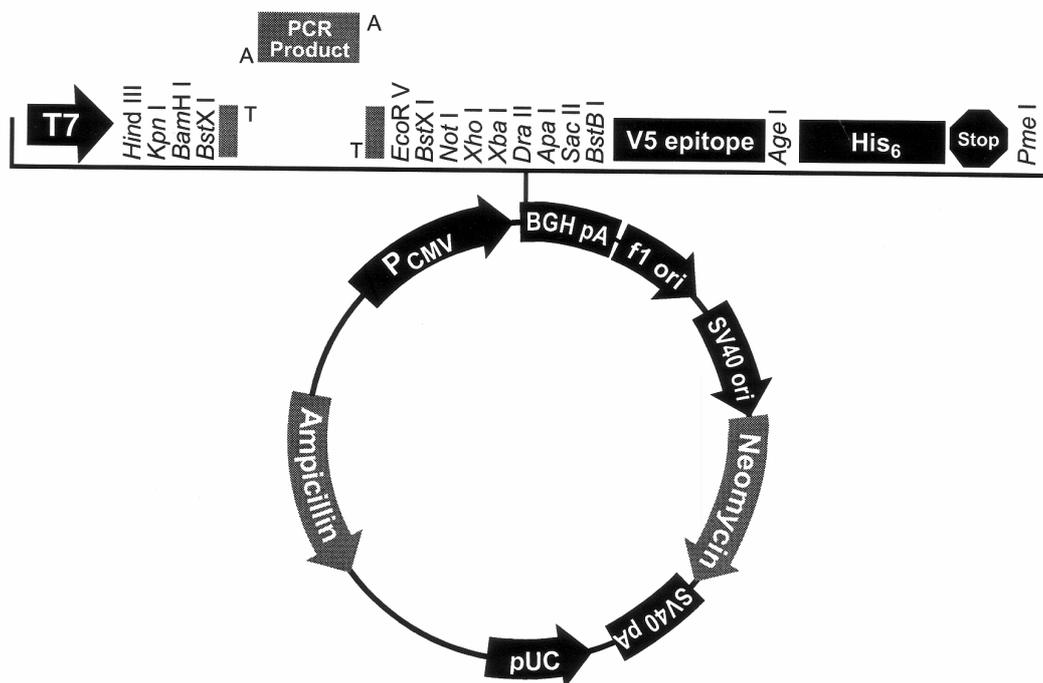


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des TOPO®-Plasmids mit integriertem PCR-Produkt (Invitrogen, Paisley, UK).

Der Ansatz für den Restriktionsverdau der Plasmid-DNA bestand aus 0,5µl Xho I-Enzym-Lösung, 0,5µl BamH I-Enzym-Lösung, 1µl BamH I-Reaktionspuffer (New England BioLabs, Beverly, USA), 0,1µl 100fach konzentriertem BSA (New England BioLabs, Beverly, USA) und 500ng Plasmid-DNA in 5µl Volumen. Die Zeitspanne und Temperatur der Inkubation richtete sich nach den entsprechenden Herstellerangaben.

3.6.6 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wurde durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz, GER durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „MegAlign“ (DNASTAR Inc., Madison, USA)

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Wachstumshemmung der kolorektalen Zelllinien HCT-116 und HT-29 bei Behandlung mit Pioglitazon

Pioglitazon ist ein beim Typ-II Diabetes eingesetztes orales Antidiabetikum, welches über den nukleären Transkriptionsfaktor PPAR- γ wirkt. Zusätzlich wurden in einigen Tumorzelllinien auch eine Wachstumshemmung nachgewiesen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Effekt von Pioglitazon auf die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT-116 und HT-29 in Hinsicht auf Wachstumsverhalten und Proteinexpression untersucht. Die dargestellten Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Kontrollzellen wurden jeweils mit einer entsprechenden Menge DMSO inkubiert.

4.1.1 Wachstumsverhalten von HCT-116 und HT-29 Zellen unter der Behandlung mit Pioglitazon

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens wurden HCT-116 und HT-29 Kolonkarzinom-Zellen 24, 48 und 72 Stunden mit 40 μ M Pioglitazon inkubiert und das Zellwachstum mit Hilfe MTT-Assay untersucht. Wie in Abb. 4.1 dargestellt, bewirkte die Behandlung mit Pioglitazon einen Rückgang der Zellzahl um ca. 10% bei den HCT-116 Zellen, bei den HT-29 Zellen um ca. 20% im Vergleich zu Kontrollzellen nach 24h. Nach 48h war die Zellzahl in beiden Zelllinien bereits um ca. 25% reduziert, nach 72h um ca. 45%.

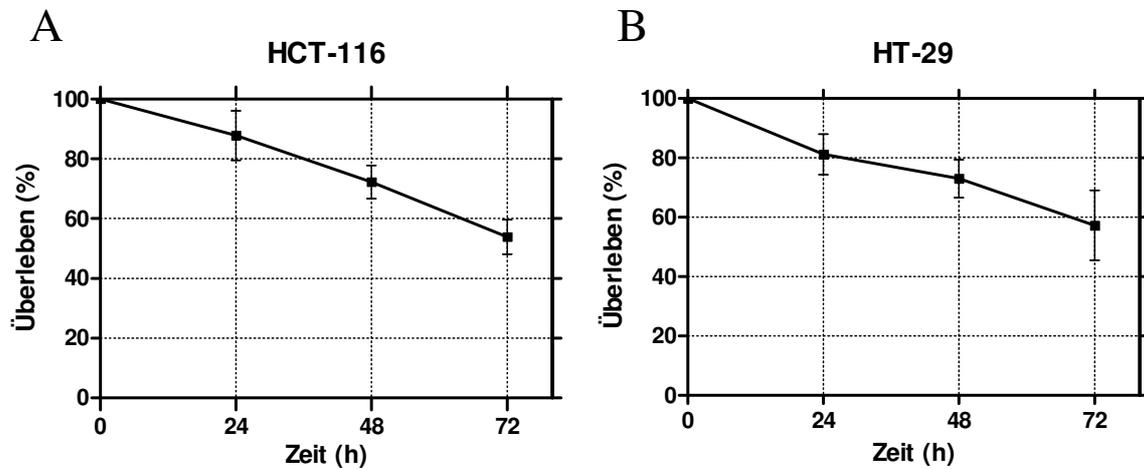


Abb. 4.1: Pioglitazon inhibiert das Zellwachstum von HCT-116 (A) und HT-29 Zellen (B). Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon inkubiert und anschließend ein MTT-Assay durchgeführt. Die Abb. A und B zeigen jeweils das prozentuale Überleben unter Pioglitazon-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, welche als 100% gesetzt wurden. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen \pm SD

Auch lichtmikroskopisch zeigte sich eine verminderte Zellzahl unter Pioglitazon-Behandlung (Abb. 4.2).

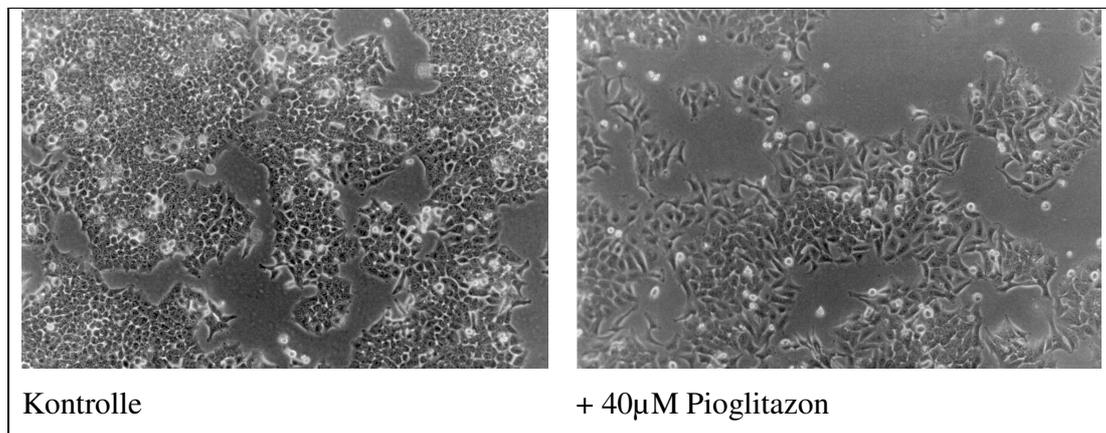


Abb. 4.2: Lichtmikroskopische Aufnahme von HCT-116 Zellen nach 48stündiger Inkubation mit und ohne 40 μ M Pioglitazon (200fache Vergrößerung).

4.1.2 Messung der LDH-Aktivität in den Überständen von mit Pioglitazon behandelten HCT-116 und HT-29 Zellen

Prinzipiell kann eine Verminderung der Zellzahl durch eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit oder durch eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen bedingt sein. Um zwischen diesen beiden Formen besser differenzieren zu können, wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) in den Mediumüberständen gemessen (Abb. 4.3). LDH wird bei der Zellyse von den Zellen an das Kulturmedium abgegeben und kann so als Marker für stattgefundenen Zelltod dienen.

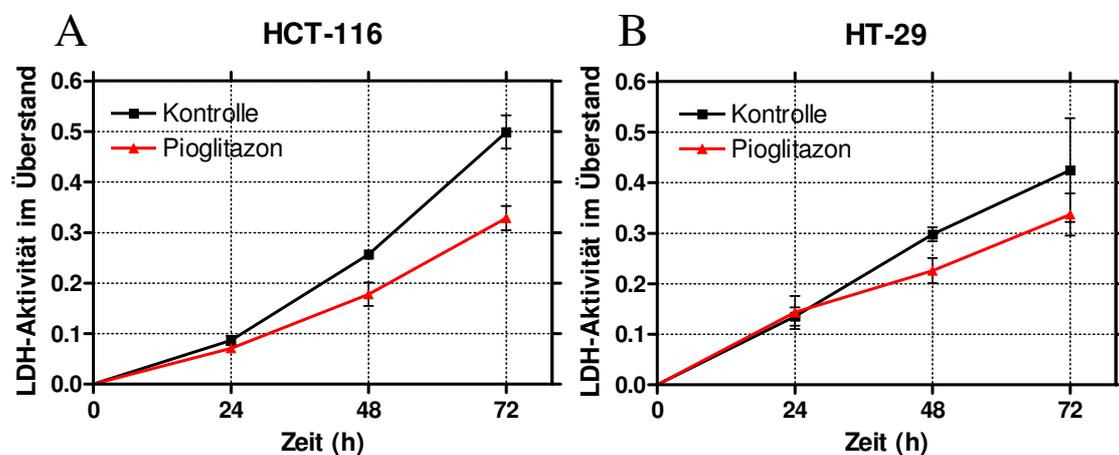


Abb. 4.3: Die Behandlung von HCT-116 (A) und HT-29 Zellen (B) mit Pioglitazon führt zu einer Erniedrigung der Laktatdehydrogenase-Aktivität in den Mediumüberständen. Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon inkubiert und anschließend ein LDH-Assay bei einer OD von 570nm durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen +/- SD

In beiden Zelllinien fand sich eine Erniedrigung der LDH-Aktivität in den Mediumüberständen unter Pioglitazon-Behandlung. Diese Reduktion der LDH-Aktivität war bei den HCT-116 Zellen bereits nach 24h nachweisbar. Hier betrug sie etwa 80% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und fiel bei 72stündiger Inkubation mit Pioglitazon auf 67% ab. Bei der HT-29 Zelllinie war erst nach 48h eine Reduktion der LDH-Aktivität um 20% messbar, die bei andauernder Inkubation konstant blieb. Diese Beobachtungen

lassen die Vermutung zu, dass Pioglitazon seinen wachstumshemmenden Effekt auf die beobachteten Zelllinien nicht über einen vermehrten Zelluntergang vermittelt.

4.2 Expression von PPAR- γ in HCT-116 Zellen

Zur Darstellung der PPAR- γ Expression in den verwendeten HCT-116 Zellen und einer möglichen Modulation durch Pioglitazon wurden Western-Blot Analysen unter Verwendung von PPAR- γ Antikörpern durchgeführt. Wie in Abb. 4.4 gezeigt wird PPAR- γ in einem hohen Maße in HCT-116 Zellen exprimiert. Die zusätzliche Inkubation mit Pioglitazon besitzt keinen regulatorischen Effekt auf die Protein-Gesamtmenge.

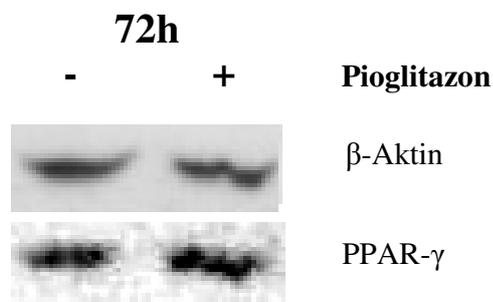


Abb. 4.4: Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus HCT-116 Zellen mit Antikörpern gegen PPAR- γ . Die Zellen wurden 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon inkubiert.

4.2.1 Untersuchungen zur PPAR- γ -Abhängigkeit der Pioglitazon-Wirkung in HCT-116 und HT-29 Zellen

Für die Familie der Thiazolidindione werden in der Literatur sowohl PPAR- γ abhängige als auch unabhängige Effekte beschrieben^{52,131,179}. Um die Frage zu klären, ob der antiproliferative Effekt auf HCT-116 und HT-29 Zellen PPAR- γ vermittelt ist, wurde in den folgenden Experimenten der selektive PPAR- γ -Inhibitor GW9662 verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für spätere Experimente wurde GW9662 in den Konzentrationen 1 μ M, 2 μ M und 2,5 μ M zu den semikonfluenten HCT-116 Zellen

zugegeben. Die Gabe von GW9662 erfolgte jeweils eine Stunde vor Verabreichung von Pioglitazon, um eine wirksame Blockade von PPAR- γ sicherzustellen. Anschließend wurden die Zellen für 48h im Brutschrank mit 40 μ M Pioglitazon inkubiert und mittels MTT-Assay der Effekt auf die Zellproliferation untersucht.

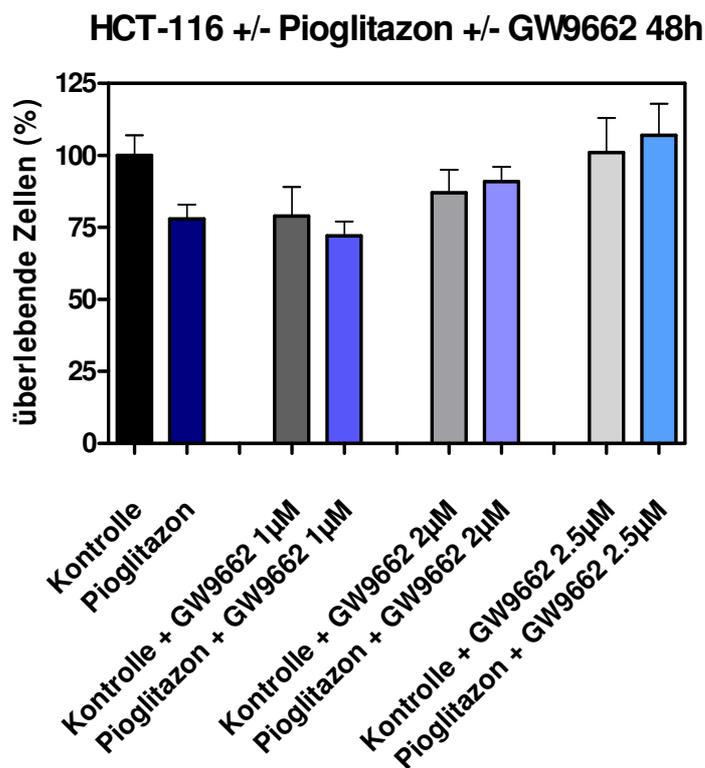


Abb. 4.5: HCT-116 wurden 48h mit und ohne 40 μ M Pioglitazon, sowie in An- und Abwesenheit des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 in den Konzentrationen 1 μ M, 2 μ M und 2,5 μ M inkubiert. Das prozentuale Überleben wurde anschließend mittels MTT-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen +/- SD.

Betrachtet man das Wachstum der Zellen über den Zeitraum von 48h mittels MTT-Assay, so fand sich ein Rückgang überlebender Zellen auf ca. 75% nach Gabe von 1 μ M des PPAR- γ Inhibitors GW9662. Während die Zellzahl der Pioglitazon-behandelten Zellen nach 48h bei etwa 75% der Kontrollzellreihe lag, zeigte sich nach Gabe von GW9662 eine konzentrationsabhängige Zunahme der Proliferation, wobei die Zellzahlen im Bereich der GW9662 behandelten Kontrollzellreihen ohne Pioglitazon lagen. Auffällig hierbei war außerdem, dass mit zunehmender Konzentration des ppar- γ -Inhibitors der antiproliferative Effekt in den Kontrollzellreihen nachließ von 25% bei 1 μ M auf beinahe 0% bei 2,5 μ M.

In den folgenden Versuchen wurde mit einer Konzentration des ppar- γ Inhibitors von 2 μ M gearbeitet, da bei dieser Konzentration sowohl proliferative, als auch antiproliferative Effekte nachweisbar bleiben.

HCT-116 und HT-29 Zellen wurden ausplattiert und für 24h, 48h und 72h mit dem PPAR- γ Inhibitor GW9662, und/oder 40 μ M Pioglitazon inkubiert. Der Einfluss auf die Zellproliferation wurde mit Hilfe MTT-Assay bestimmt (siehe Abb. 4.6 und 4.7)

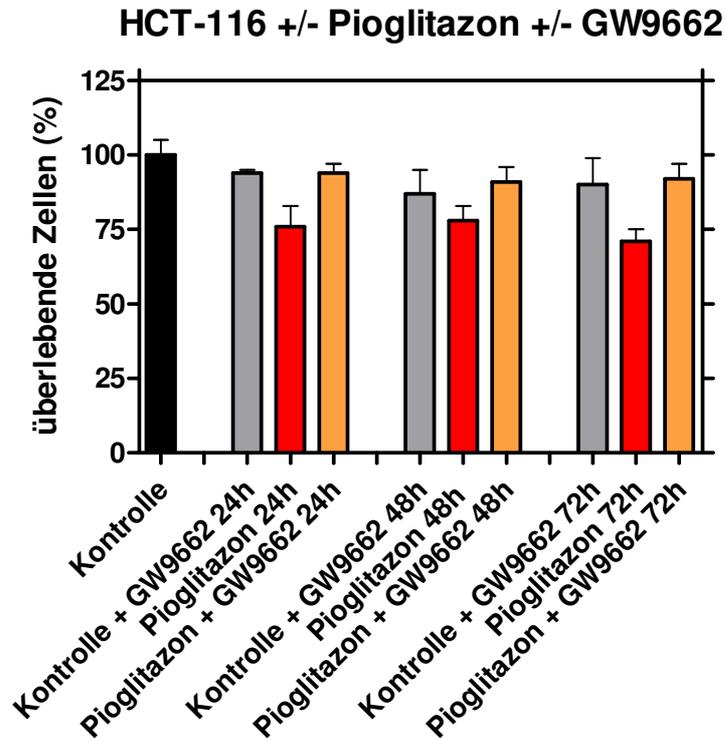


Abb. 4.6: Der wachstumshemmende Effekt von Pioglitazon auf HCT-116 Zellen ist PPAR- γ abhängig. Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit und ohne 40 μ M Pioglitazon, sowie in An- und Abwesenheit von 2 μ M des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 inkubiert. Das prozentuale Überleben wurde anschließend mittels MTT-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD

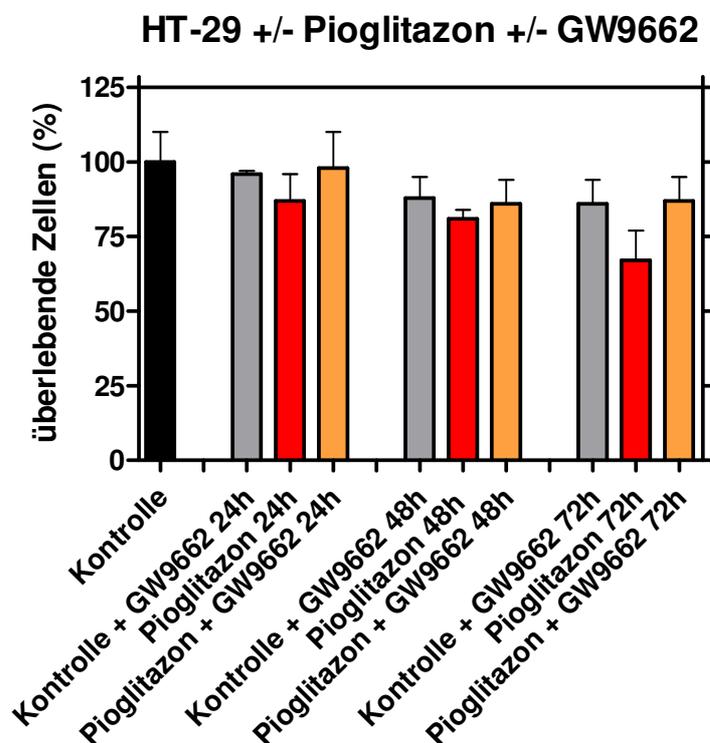


Abb. 4.7: Der wachstumshemmende Effekt von Pioglitazon auf HT-29 Zellen ist PPAR- γ abhängig. Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit und ohne 40 μ M Pioglitazon, sowie in An- und Abwesenheit von 2 μ M des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 inkubiert. Das prozentuale Überleben wurde anschließend mittels MTT-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD

	HCT-116			HT-29		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrolle + 2 μ M GW9662	94%	87%	90%	96%	88%	86%
40 μ M Pioglitazon	76%	78%	71%	87%	81%	67%
40 μ M Pioglitazon + 2 μ M GW9662	94%	91%	92%	98%	86%	87%

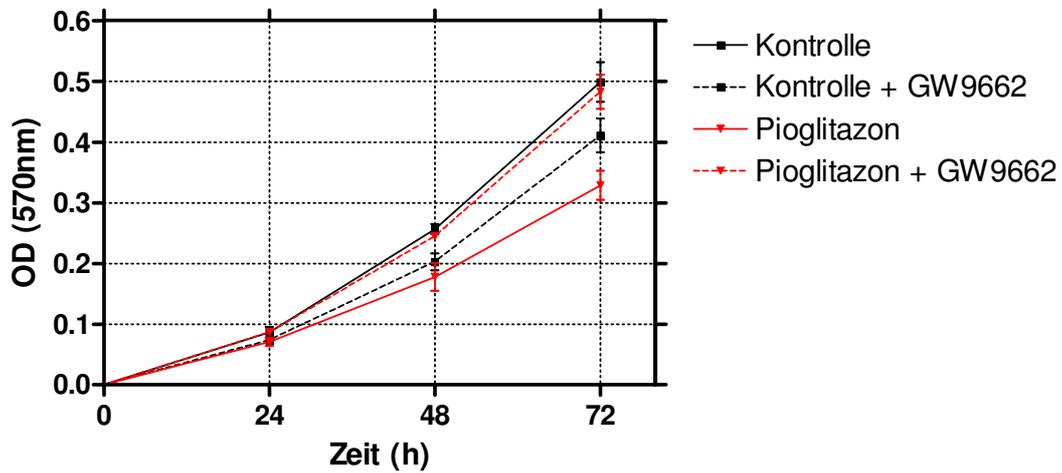
Tab. 4.1: Übersicht über das prozentuale Überleben von HCT-116 und HT-29 Zellen nach 24h, 48h und 72h bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Pioglitazon und 2 μ M des PPAR- γ Antagonisten GW9662. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen.

Wie Abb. 4.6 und 4.7, bzw. Tab. 4.1 zeigen, konnte der antiproliferative Effekt von Pioglitazon durch die vorherige Inkubation der Zellen mit 2 μ M GW9662 aufgehoben werden, wobei in beiden Zellreihen die Anzahl überlebender Zellen bei Behandlung mit Pioglitazon und GW9662 im Bereich der Kontrollzellen mit alleiniger GW9662-Behandlung lagen.

Zur weiteren Untersuchung, ob mit Hilfe des PPAR- γ Inhibitors GW9662 der antiproliferative Effekt von Pioglitazon aufgehoben werden kann, wurde die LDH-Aktivität in den Überständen von HCT-116 und HT-29 Zellen bestimmt, nachdem diese ausschließlich mit 2 μ M GW9662, oder ausschließlich mit 40 μ M Pioglitazon oder mit Pioglitazon und GW9662 inkubiert worden waren. Auch hier ließ sich die durch Gabe von Pioglitazon verursachte Erniedrigung der LDH-Aktivität durch GW9662 antagonisieren. Dieser Effekt war bei den HCT-116 Zellen nach 72h besonders ausgeprägt, wo die LDH-Aktivität unter Pioglitazon-Behandlung zu einer OD(570nm) von 0,33 führte und durch die zusätzliche Behandlung mit GW9662 auf 0,48 anstieg, womit sie in dem Bereich un behandelter Kontrollzellen lag. Ähnlich, wenn auch weniger ausgeprägt, verhielt es sich bei den HT-29 Zellen (Abb. 4.8), bei denen die OD(570nm) unter Pioglitazon-Behandlung nach 72h bei 0,337 lag und durch die Gabe von GW9662 auf 0,407 gesteigert werden konnte.

A

LDH-Aktivität im Überstand HCT-116



B

LDH-Aktivität im Überstand von HT-29

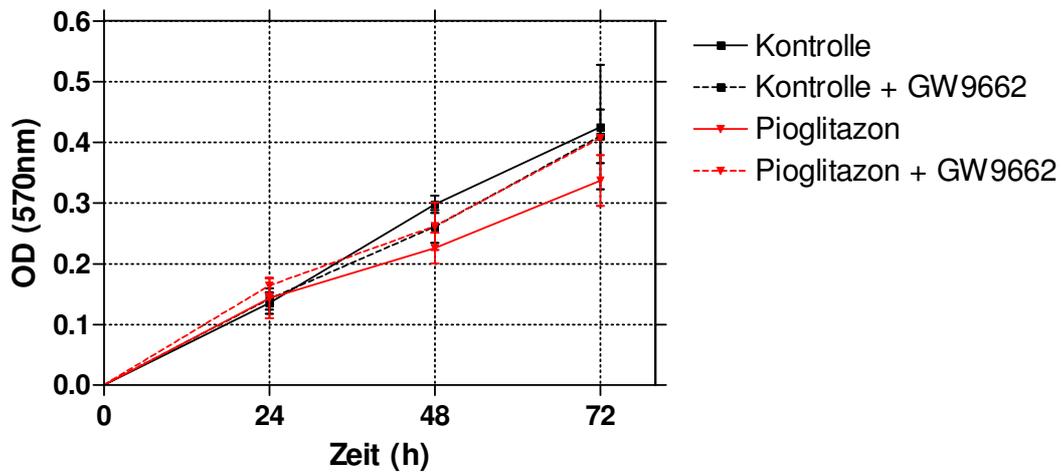


Abb. 4.8: Die durch Pioglitazon vermittelte Erniedrigung der LDH-Aktivität in den Mediumüberständen von HCT-116 (A) und HT-29 Zellen (B) ist PPAR- γ abhängig. Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon und 2 μ M des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 inkubiert und anschließend ein LDH-Assay durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen +/- SD

4.3 Apoptose- und Zellzyklusuntersuchungen

In der Literatur wurden durch Aktivierung von PPAR- γ sowohl Apoptose-Induktion^{22,61,186}, als auch Wirkungen auf den Zellzyklus^{54,83,104,143} beschrieben. In den folgenden Versuchen wurde der Effekt von Pioglitazon auf die Induktion von Apoptose und den Zellzyklus in HCT-116 Zellen untersucht.

4.3.1 Zellzyklusuntersuchungen Pioglitazon-behandelter

HCT-116 Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist die Zuordnung von Zellen in einzelne Zellzyklusphasen möglich. Auf diese Weise lassen sich Störungen der Zellteilung registrieren.

Um die Frage zu klären, ob Pioglitazon Einfluss auf den Zellzyklus von HCT-116 Zellen hat, wurde die Zellzyklusverteilung von Pioglitazon behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht. Hierfür wurden HCT-116 Zellen 24, 48 und 72 Stunden unter subkonfluenten Bedingungen mit und ohne Pioglitazon inkubiert, geerntet und anschließend eine DNA-Anfärbung der fixierten und permeabilisierten Zellen mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt.

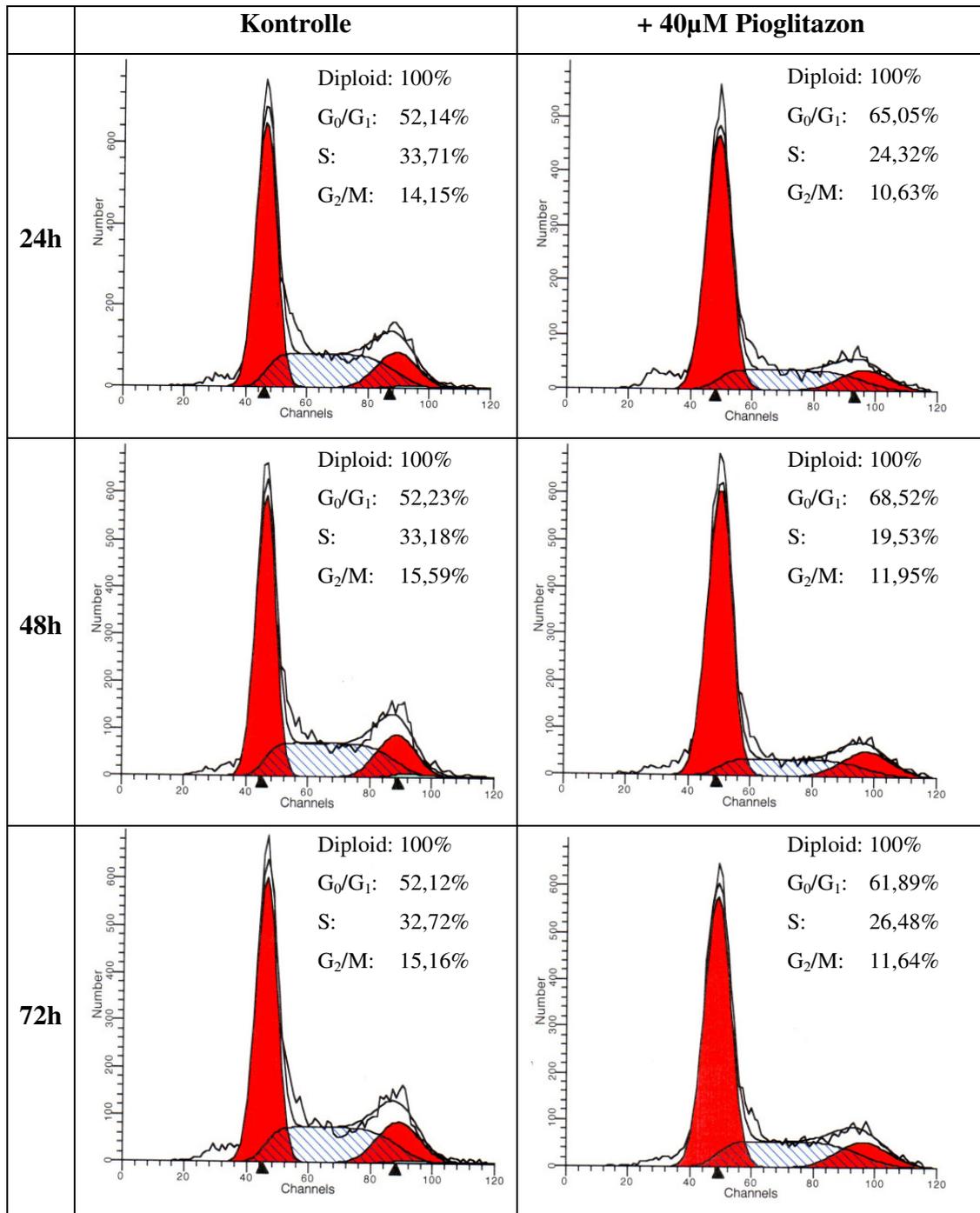


Abb. 4.9: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon bewirkt einen G₀/G₁-Zellzyklusarrest. Zellen wurden 24, 48 und 72h in Ab- (A) und Anwesenheit von 40 μ M Pioglitazon inkubiert und anschließend die Zellzyklusverteilung im Durchflusszytometer untersucht. Die Abbildung zeigt exemplarisch ein repräsentatives Ergebnis eines Versuchs.

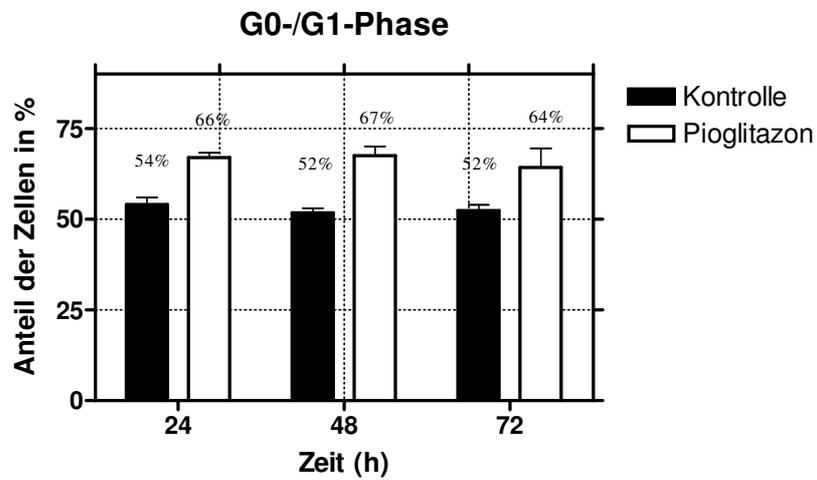


Abb. 4.10: Prozentualer Anteil der mittels FACS gemessenen HCT-116 Zellen in der G₀/G₁-Phase. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

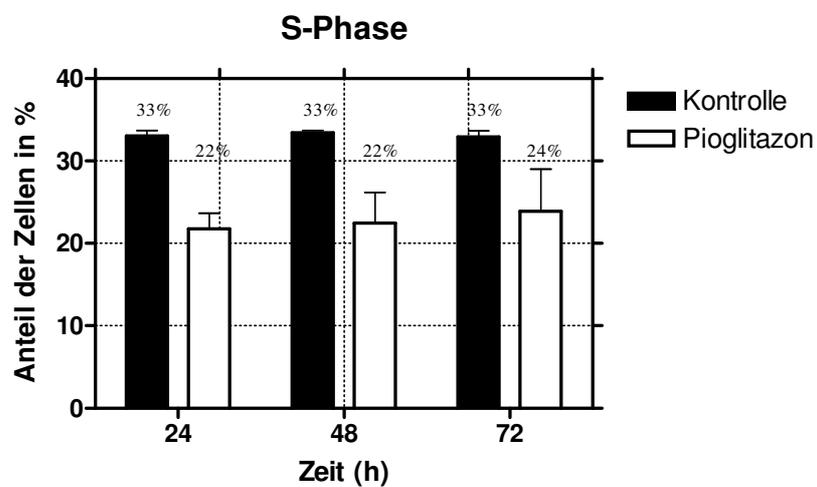


Abb. 4.11: Prozentualer Anteil der mittels FACS gemessenen HCT-116 Zellen in der S-Phase. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

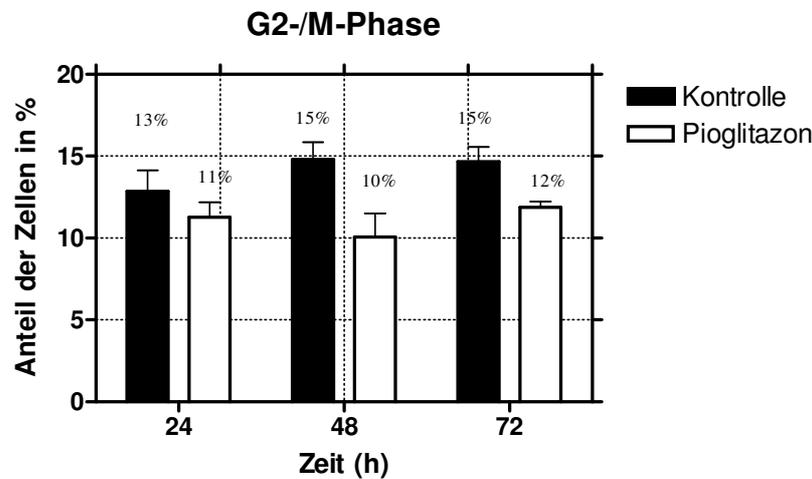


Abb. 4.12: Prozentualer Anteil der mittels FACS gemessenen HCT-116 Zellen in der G₂/M-Phase. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

Die Messung im Durchflusszytometer zeigte bereits nach 24stündiger Inkubation mit Pioglitazon eine Erhöhung der Zellen in der G₀/G₁-Phase um 10-15%, welche auch bei längerer Inkubationszeit etwa konstant blieb. Dieser G₀/G₁-Phase-Arrest hatte eine ca. 10%ige Erniedrigung der Zellen in der S-Phase zur Folge (siehe Abb. 4.9-4.12).

4.3.1.1 Wirkung von Pioglitazon auf die Expression Zellzyklus-regulierender Proteine in HCT-116 Zellen

Der Zellzyklus wird über ein komplexes Netzwerk von positiven und negativen Regulator-Molekülen beeinflusst. Zu diesen Molekülen gehören die Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks), die Cycline und diverse andere Proteine wie p21^{cip1/waf1}, p27 und p53. Um die Rolle dieser Proteine auf den durch Pioglitazon induzierten Zellzyklus-Arrest in HCT-116 Zellen zu untersuchen, wurden Proteinextrakte aus Zellen hergestellt, die vorher über 24h, 48h und 72h mit 40µM Pioglitazon behandelt wurden. Anschließend wurden Western-Blot Analysen durchgeführt, bei denen Antikörper gegen cdc2, cdk4, Cyclin D₃, p21^{cip1/waf1} und p53 verwendet wurden.

4.3.1.1.1 cdk4 und Cyclin D₃

An dem Übergang von der G1- zur S-Phase sind diverse Proteine beteiligt, unter anderem cdk4 und Cyclin D₃. Mittels Western-Blot wurde für verschiedene Zeiträume die Expression dieser Enzyme in An- und Abwesenheit von Pioglitazon untersucht. Wie in Abb. 4.13 dargestellt, führte die Behandlung mit 40µM Pioglitazon nach 48h zu einer Erniedrigung der Proteinexpression von cdk4 und Cyclin D₃. Dieser Effekt war nach 72h am stärksten nachweisbar.

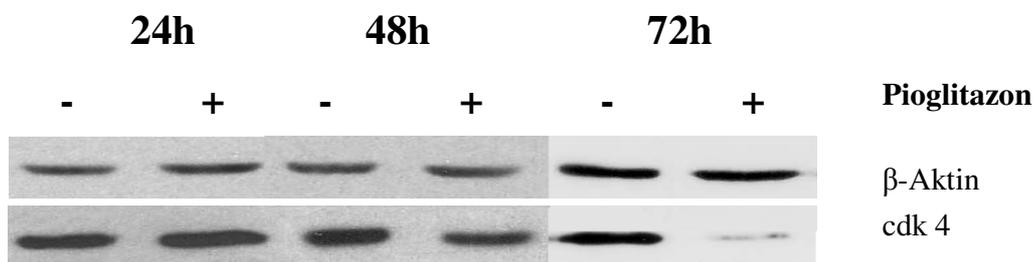


Abb. 4.13: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon bewirkt eine Erniedrigung der Proteinmenge von cdk4. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen cdk4 durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

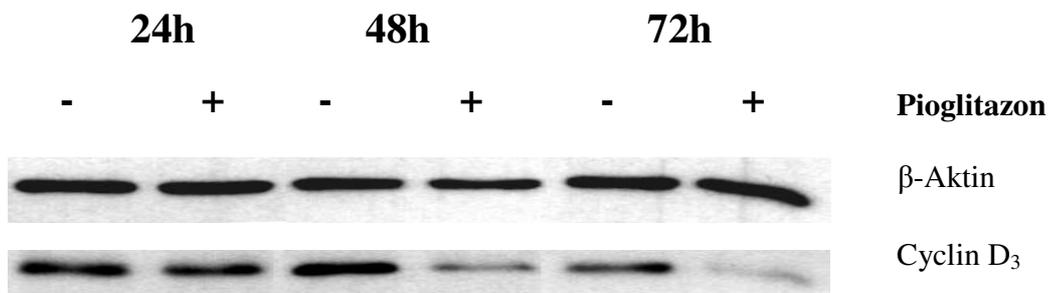


Abb. 4.14: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon bewirkt eine Erniedrigung der Proteinmenge von Cyclin D₃. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen Cyclin D₃ durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

4.3.1.1.2 p21^{cip1/waf1}

Schädigung der DNA führt zu einer Stabilisierung des p53-Proteins, welches als Transkriptionsfaktor die Synthese des „cyclin dependent kinase“-Inhibitors (CKI) p21^{cip1/waf1} induziert⁴¹. p21^{cip1/waf1} führt über die Hemmung der cdk2 zu einem Arrest des Zellzyklus in der G₁-Phase^{7,40}. Um zu untersuchen, ob Pioglitazon seine Wirkung auf den Zellzyklus zusätzlich über die Beeinflussung von p21^{cip1/waf1} entfaltet, wurden HCT-116 Zellen wie unter 4.3.1.1 behandelt und ein Western-Blot mit Antikörpern gegen p21^{cip1/waf1} durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich bereits nach 24h eine Erniedrigung der p21^{cip1/waf1} Expression unter Pioglitazon-Behandlung, welche nach 72h noch ausgeprägter war (Abb. 4.15).

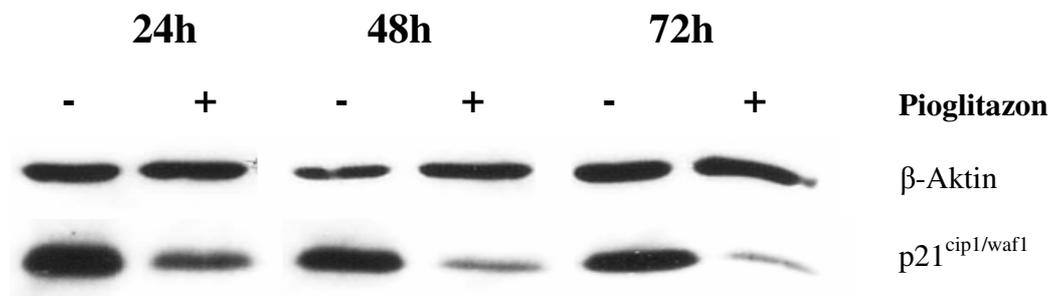


Abb. 4.15: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon bewirkt eine Erniedrigung der Proteinmenge von p21^{cip1/waf1}. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen p21^{cip1/waf1} durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

4.3.1.1.3 cdc2

Cdc2 (auch cdk1 genannt) spielt eine bedeutende regulatorische Rolle beim Übergang des Zellzyklus von der G₂- zur M-Phase^{7,111}. Um zu untersuchen, ob Pioglitazon auch auf den G₂-checkpoint wirkt, wurde mittels Western-Blot Analyse die Proteinexpression von cdc2 untersucht. Dabei konnte zu keinem der drei gemessenen Zeitpunkte eine Regulation nachgewiesen werden.

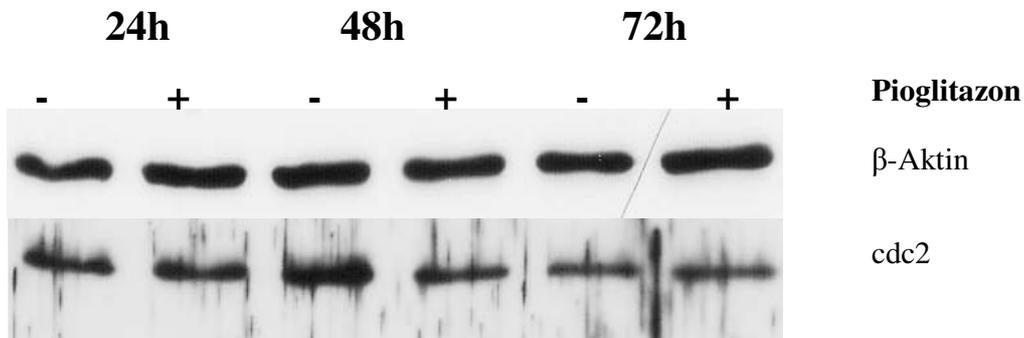


Abb. 4.16: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von cdc2/cdk1. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen cdc2 durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β -Aktin durchgeführt.

4.3.2 Apoptoseverhalten Pioglitazon-behandelter HCT-116

Zellen

Beeinträchtigungen des Zellzyklus und Apoptose sind oft eng miteinander assoziiert⁶⁸, da Störungen im normalen Ablauf des Zellzyklus Apoptose zur Folge haben können. Neben dem Zellzyklus-Arrest könnte die beobachtete Inhibition des Zellwachstums der mit Pioglitazon behandelten HCT-116 Zellen also auch durch Apoptose bedingt sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HCT-116 Zellen 24, 48 und 72 Stunden mit 40 μ M Pioglitazon inkubiert und der Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mittels Propidiumiodid-(PI)-Färbung und anschließender FACS-Messung ermittelt. Wie in Abb. 4.17 zu sehen, bewirkt Pioglitazon zu allen drei gemessenen Zeitpunkten einen moderaten Anstieg der apoptotischen Zellen um 4-6%.

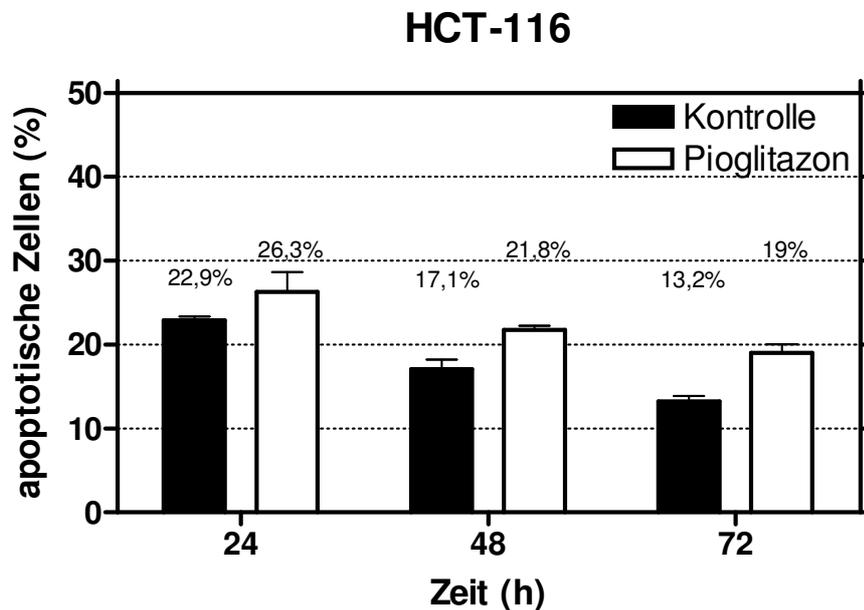


Abb. 4.17: Pioglitazon vermittelt eine moderate Apoptose-Induktion in HCT-116 Zellen. Die Zellen wurden ohne (A) und mit (B) 40 μ M Pioglitazon über 24, 48 und 72h inkubiert. Anschließend wurde der Anteil apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an allen getageten Zellen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen sowie die SD

4.3.2.1 Wirkung von Pioglitazon auf die Expression von pro-apoptischen Proteinen

Um die Frage zu klären, ob die Behandlung mit Pioglitazon zu einer Aktivierung von Caspasen führt, wurden HCT-116 Zellen 24h, 48h und 72h mit 40 μ M Pioglitazon inkubiert und anschließend die Prozessierung der Caspasen 3, 9 und 10 mittels Western-Blot Analyse untersucht. Wie in Abb. 4.19 gezeigt, führt die Behandlung mit Pioglitazon in HCT-116 Zellen zu einer verminderten Proteinexpression der 46kD großen Procaspase 9, was jedoch nicht auf die Aktivierung durch Spaltung zurückzuführen ist, da auch das 30kD große Spaltprodukt vermindert nachweisbar war. Bei Caspase 3 und 10 zeigte sich hingegen

weder eine Regulation der inaktiven noch der aktiven Form (Abb. 4.18 und 4.20). Auch für den Transkriptionsfaktor p53, welcher bei Zellschädigung in der Lage ist, Apoptose zu initiieren⁶, konnte mittels Western-Blot keine Regulation nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.21)

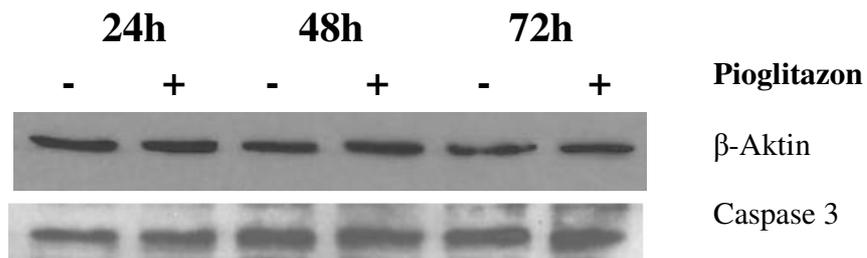


Abb. 4.18: Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus HCT-116 Zellen mit Antikörpern gegen Caspase 3. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

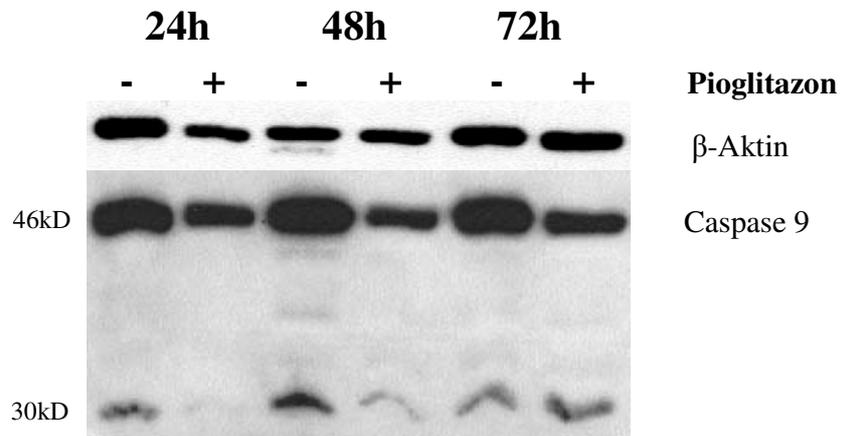


Abb. 4.19: Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus HCT-116 Zellen mit Antikörpern gegen Caspase 9. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

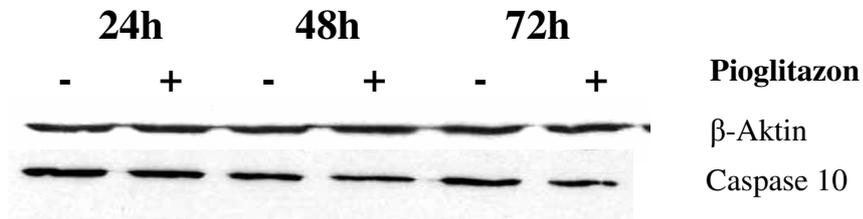


Abb. 4.20: Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus HCT-116 Zellen mit Antikörpern gegen Caspase 10. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

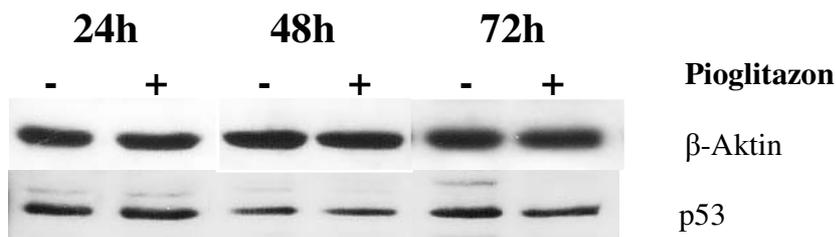


Abb. 4.21: Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus HCT-116 Zellen mit Antikörpern gegen p53. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

Diese Ergebnisse unterstützen die in 4.3.2 gewonnenen Erkenntnisse, dass Pioglitazon seinen wachstumshemmenden Effekt auf HCT-116 Zellen nicht über die Induktion von Apoptose vermittelt.

4.3.2.2 Wirkung von Pioglitazon auf die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase PARP

Werden Zellen besonderem Stress, z.B. durch ionisierende Strahlen, Alkylantien oder Oxidation ausgesetzt, kann es zur Schädigung der DNA, wie Doppel- und Einzelstrangbrüchen kommen. Dies führt unter anderem zu einer proteolytischen Aktivierung von PARP, einem Protein, welches - abhängig vom Ausmaß der Schädigung - DNA-Reparaturenzyme aktiviert oder Apoptose der Zelle initiiert¹⁸. HCT-116 wurden über unterschiedliche Zeiträume mit 40µM Pioglitazon behandelt und Gesamtproteinextrakte hergestellt. Anschließend wurde die Auswirkung auf die PARP-Spaltung mittels Western-Blot untersucht. Parallel wurden Gesamtproteinextrakte von HCT-116 hergestellt, die zusätzlich mit 2µM des PPAR-γ Inhibitors GW9662 behandelt wurden.

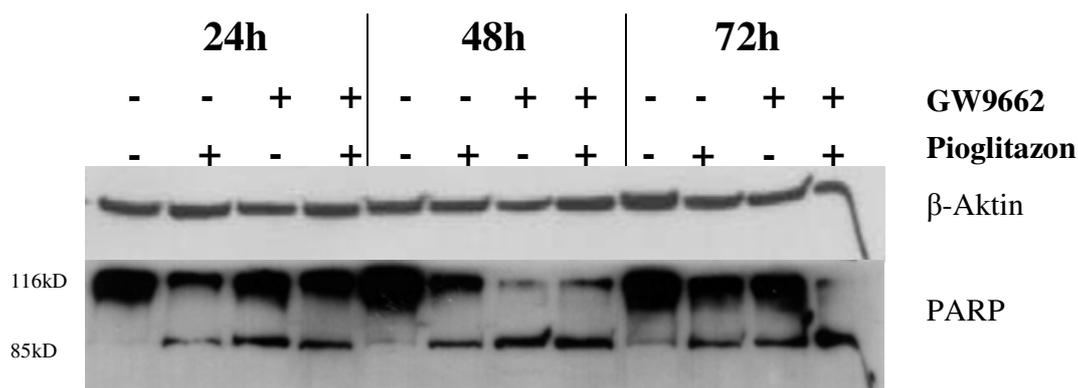


Abb. 4.22: Pioglitazon bewirkt eine Spaltung von PARP in HCT-116 Zellen. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon sowie mit und ohne den selektiven PPAR-γ Antagonisten GW9662 inkubiert. Anschließend wurde ein Western-Blot mit Antikörpern gegen proPARP (116kD) und aktives PARP (85kD) durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

Die Inkubation von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon führte zu einer Spaltung des 116kD großen proPARP in das 85kD große, aktive PARP. Diese Spaltung lässt sich auch durch die Gabe von GW9662 nicht antagonisieren. Vielmehr bewirkt schon eine alleinige Behandlung mit GW9662 eine PARP-Spaltung (siehe Abb. 4.22).

4.3.2.3 Wirkung des Tumornekrosefaktor-assoziierten Apoptose induzierenden Liganden (TRAIL) auf HCT-116 Zellen

In einigen Studien konnte für Pioglitazon eine Hochregulation von p21^{cip1/waf1} gezeigt werden, die einen verstärkenden Effekt auf die Apoptose-Induktion durch den Tumornekrosefaktor-assoziierten Apoptose induzierenden Liganden (TRAIL) zur Folge hatte^{59,61}. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde untersucht, ob die unter 4.3.1.1.2 detektierte Erniedrigung der Proteinexpression von p21^{cip1/waf1} einen Einfluss auf die Apoptose-Induktion durch TRAIL in HCT-116 Zellen besitzt. Zunächst wurde die Sensibilität der Zellen gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose bestimmt. Hierzu wurden die Zellen ausgesät, 16 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem TRAIL inkubiert und anschließend das Zellwachstum mittels MTT-Assay bestimmt. Wie Abb. 4.23 zeigt, nahm die Zellzahl bei zunehmender Menge an TRAIL ab: Um 3% nach Zugabe von 1ng/ml, bzw. 52% bei 25ng/ml TRAIL.

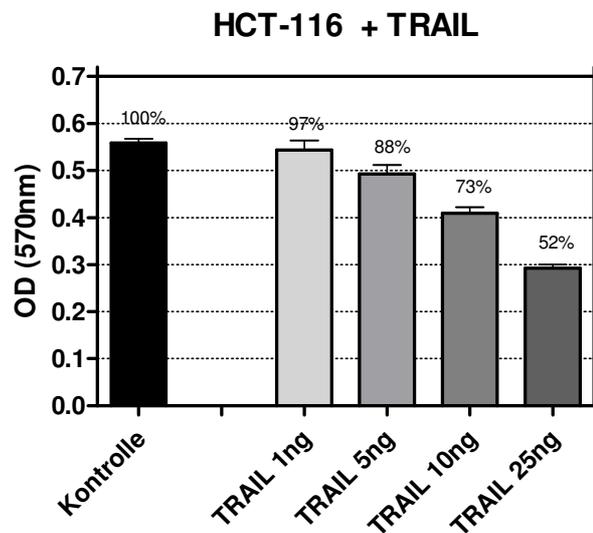


Abb. 4.23: HCT-116 Zellen sind sensibel gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Die Zellen wurden 16 Stunden in An- und Abwesenheit von TRAIL in den Konzentrationen 1, 5, 10 und 25 ng/ml inkubiert. Anschließend wurde eine MTT-Assay durchgeführt. Die Prozentangaben zeigen das prozentuale Überleben bezogen auf nur mit DMSO behandelte Kontrollzellen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

Für die weiteren Versuche wurde eine Konzentration von 10ng/ml TRAIL gewählt, da bei dieser Menge sowohl proliferative als auch antiproliferative Effekte besser zu beurteilen sind. Um zu klären, ob die Aktivierung von ppar- γ einen zusätzlichen Effekt auf die durch TRAIL induzierte Apoptose hat, wurden HCT-116 Zellen zunächst mit 40 μ M des PPAR- γ Agonisten Pioglitazon über unterschiedliche Zeiträume behandelt. Jeweils 16 Stunden vor Versuchsende wurden 10ng/ml TRAIL zum Nährmedium hinzugefügt und anschließend ein MTT-Assay durchgeführt.

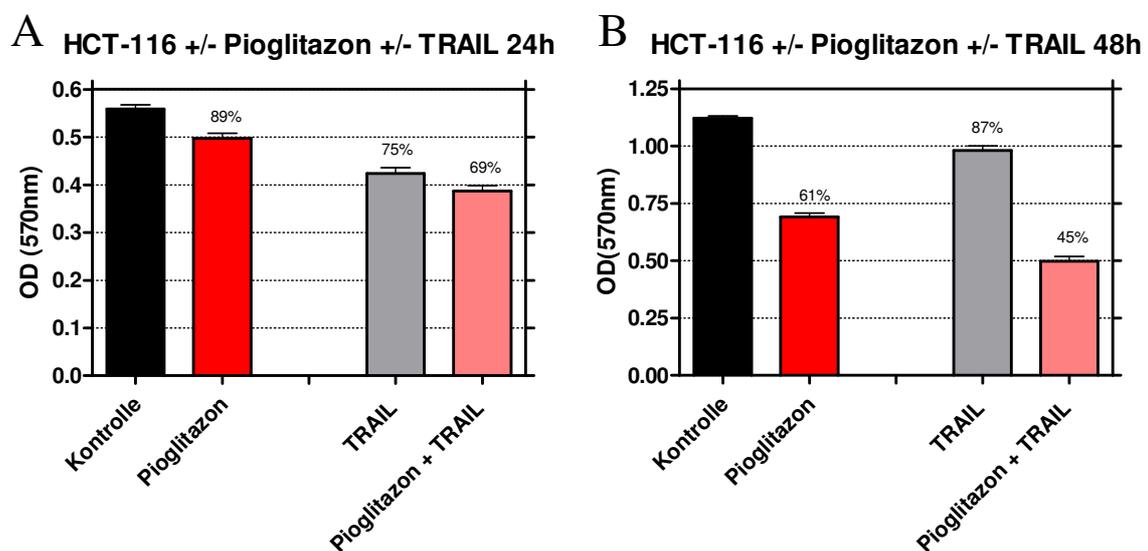


Abb. 4.24: Die gleichzeitige Gabe von Pioglitazon führt nicht zu einer Sensibilisierung von HCT-116 Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Die Zellen wurden 24h (A) und 48h (B) mit 40 μ M Pioglitazon behandelt. Jeweils 16h vor Versuchsende wurden 10ng/ml rekombinantes TRAIL hinzugegeben und anschließend ein MTT-Assay durchgeführt. Die Prozentangaben zeigen das prozentuale Überleben bezogen auf nur mit DMSO behandelte Kontrollzellen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

Wie in Abb. 4.24A gezeigt, führt die 24stündige Inkubation mit 40 μ M Pioglitazon zu einer Reduktion der Zellzahl um ca. 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Während die Behandlung mit 10ng TRAIL die Zahl vitaler Zellen bereits um 25% verringert, lässt sich dieser Effekt durch eine gleichzeitige Inkubation mit Pioglitazon nicht mehr

signifikant steigern. Gleiches gilt auch für Inkubationszeiten mit Pioglitazon von 48 Stunden (Abb. 4.24B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Pioglitazon einen additiven, jedoch keinen sensibilisierenden Effekt auf die TRAIL-assoziierte Apoptose besitzt.

4.3.2.4 Wirkung des Tumornekrosefaktor-assoziierten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) auf HT-29 Zellen

Analog zu dem unter 4.3.2.3 geschilderten Versuchsaufbau wurde im Folgenden der Effekt von Pioglitazon auf HT-29 Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit TRAIL untersucht. Die Zellen wurden 24h und 48h mit 40 μ M Pioglitazon kultiviert. 16h vor Versuchsende wurden zusätzlich 10ng/ml TRAIL hinzugegeben und anschließend der Anteil überlebender Zellen mittels MTT-Assay bestimmt.

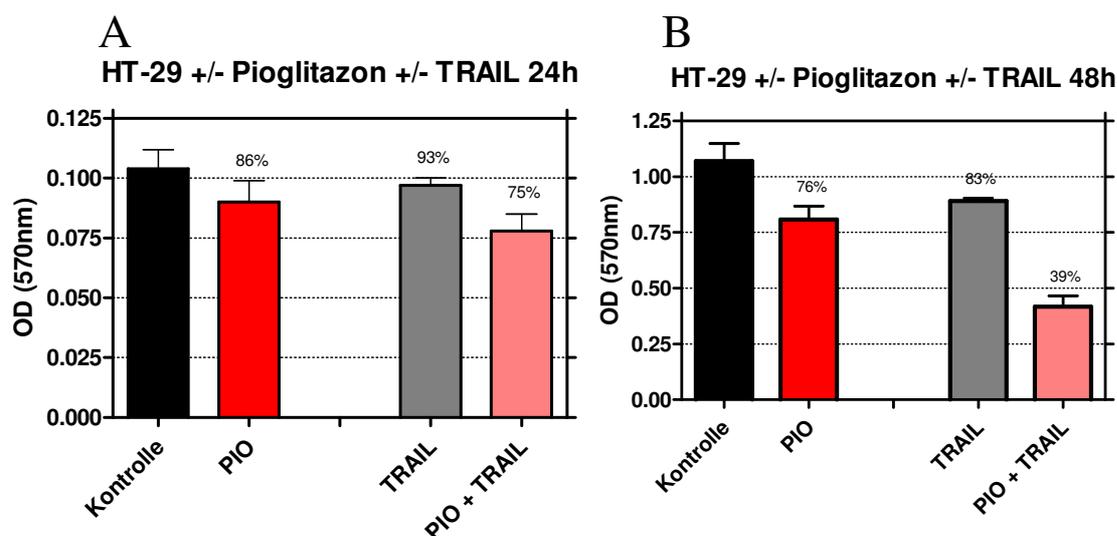


Abb. 4.25: Die gleichzeitige Gabe von Pioglitazon führt zu einer Sensibilisierung von HT-29 Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Die Zellen wurden 24h (A) und 48h (B) mit 40 μ M Pioglitazon behandelt. Jeweils 16h vor Versuchsende wurden 10ng/ml rekombinantes TRAIL hinzugegeben und anschließend ein MTT-Assay durchgeführt. Die Prozentangaben zeigen das prozentuale Überleben bezogen auf nur mit DMSO behandelte Kontrollzellen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

Wie in Abb. 4.25A gezeigt, führt die 24stündige Inkubation mit 40 μ M Pioglitazon zu einer Reduktion der Zellzahl um ca. 15% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während die Zellzahl durch die Behandlung mit TRAIL um 7% verringern werden konnte. Die gleichzeitige Inkubation von HT-29 Zellen mit Pioglitazon und TRAIL erbrachte eine Reduktion der Zellmasse um 25%. Dass Pioglitazon einen sensibilisierenden Effekt auf die durch TRAIL induzierte Apoptose besitzt, konnte besonders deutlich nach 48h gezeigt werden (Abb. 4.25B). Hier bewirkte die alleinige Inkubation mit Pioglitazon eine Reduktion der Zellzahl um ca. 25%, die mit TRAIL um 17%. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Pioglitazon und TRAIL hingegen vermochte den Anteil überlebender Zellen um ca. 60% zu reduzieren.

4.4 Untersuchung der Proteinexpression und -phosphorylierung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in HCT-116 Zellen

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist die Auftrennung von Gesamtproteinextrakten in einzelne Proteinpunkte (Spots) möglich. Hierbei werden die Proteine während der isoelektrischen Fokussierung nach ihrem pH-Wert aufgetrennt und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrer Größe. Mit dieser Methode ist es möglich, einen großen Anteil an Proteinen auf ihre Regulation hin zu überprüfen.

Hierzu wurden HCT-116 Zellen über 24h, 48h und 72 Stunden mit 40 μ M Pioglitazon behandelt und anschließend Gesamtproteinextrakte hergestellt. Nach zweidimensionaler Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb.4.26).

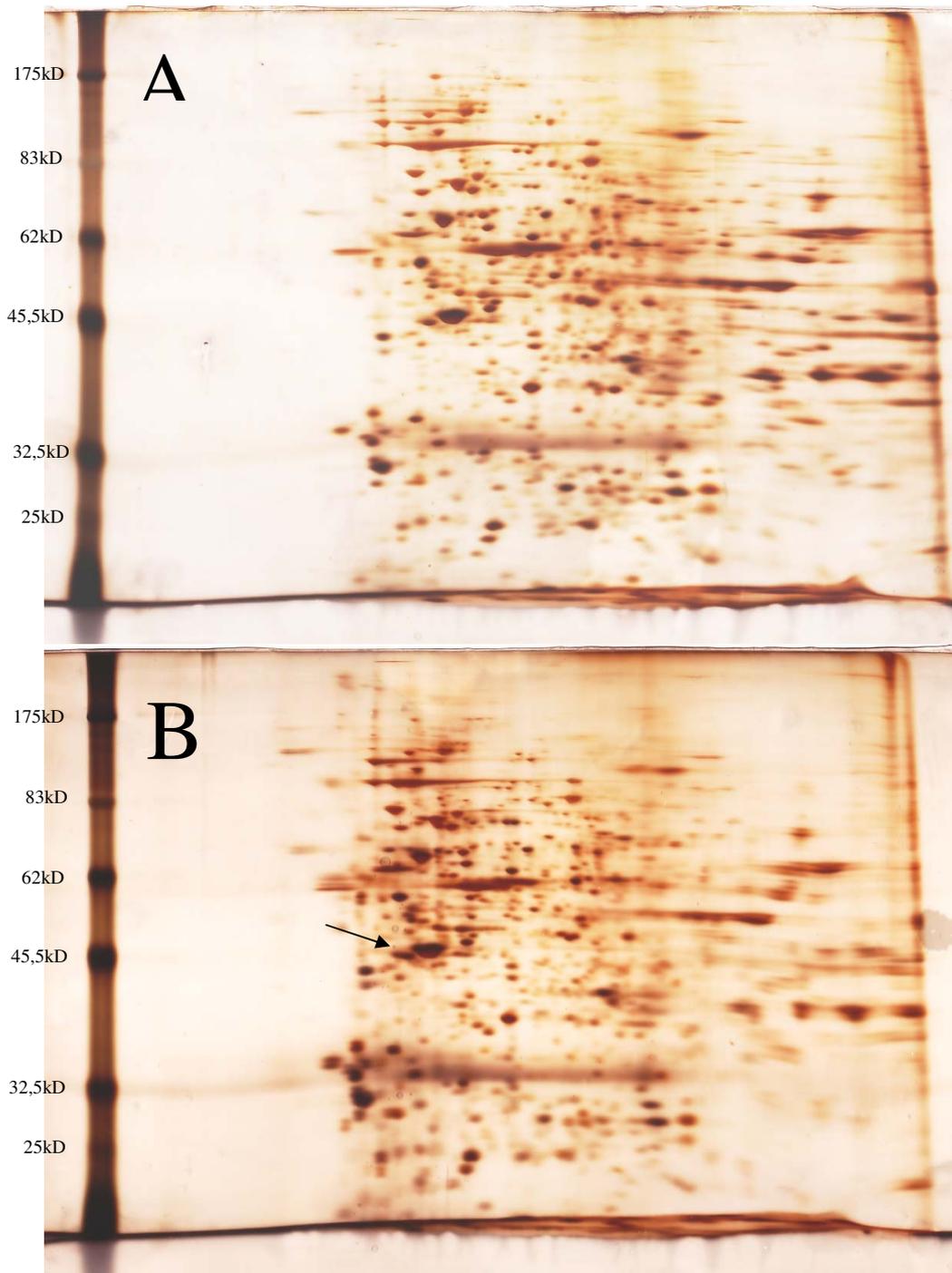


Abb. 4.26: Silberfärbung einer zweidimensionalen Gelelektrophorese von Gesamtprotein-Extrakten aus HCT-116 Zellen nach 72h. A: Kontrolle; B: + 40 μ M Pioglitazon. Der schwarze Pfeil in B deutet auf einen Unterschied in Bezug auf das Proteinmuster hin.

In Abb. 4.26 sind beispielhaft für die anderen Inkubationszeiten Silberfärbungen von 72 Stunden Extrakten dargestellt. Der Schwerpunkt der pH-Wert Auftrennung lag hierbei bei pH 3-10. Bis auf die mit Pfeil markierte Stelle in B weisen sie keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzungen auf. Das betreffende Protein wurde mittels MALDI-TOF Analyse untersucht und identifiziert (siehe 4.5).

Da die Regulation der zellulären Aktivität nicht nur durch die veränderte Proteinexpression, sondern unter anderem auch mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung erfolgen kann, wurden Gesamtproteinextrakte in Hinsicht auf ihr Phosphorylierungsmuster untersucht. Dabei wurden die Proteine nach zweidimensionaler Gelelektrophorese mit ProQ®-Diamond-Phosphoprotein-Färbung behandelt und auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

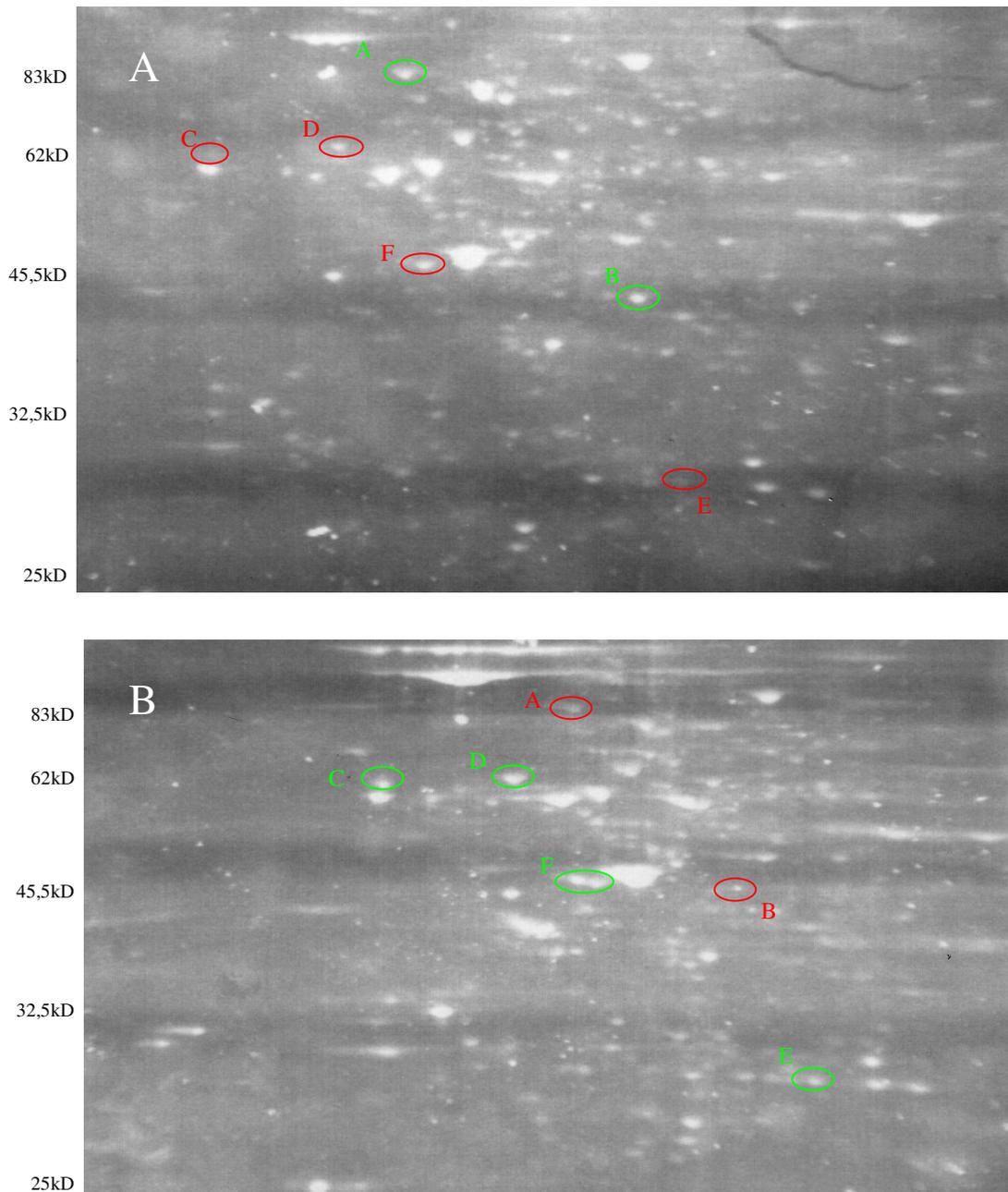
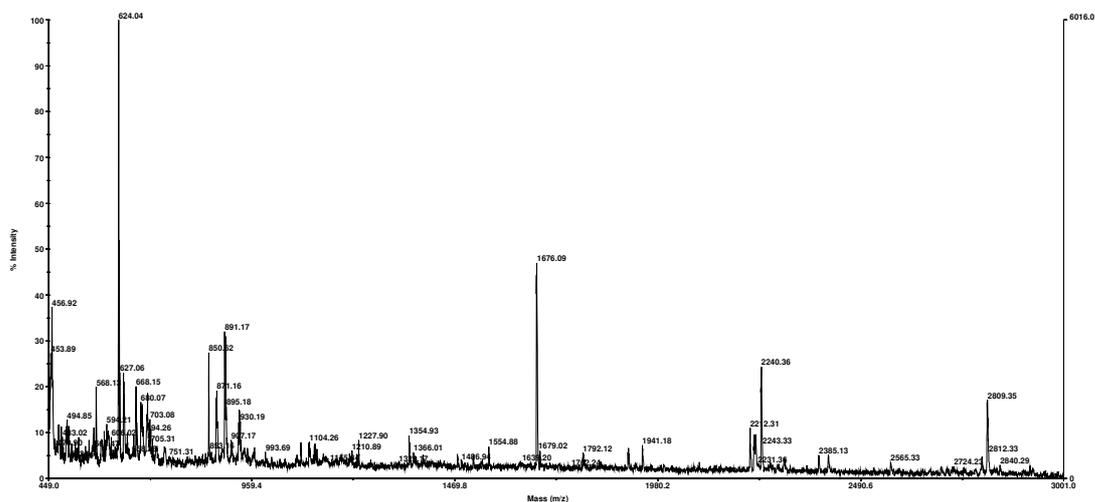


Abb. 4.27: Phosphoprotein-Färbung einer zweidimensionalen Gelelektrophorese von Gesamtprotein-Extrakten von HCT-116 Zellen nach 72h. Unterschiede im Phosphorylierungsmuster sind mit Kreisen gekennzeichnet (Grün: in der jeweiligen Abbildung hoch reguliert, Rot: in der jeweiligen Abbildung runter reguliert). A: Kontrolle; B: + 40μM Pioglitazon

Bei der Phosphoprotein-Färbung zeigte sich für das in der Silberfärbung regulierte Protein F ein deutlicher Unterschied im Phosphorylierungsmuster mit einer vermehrten Phosphorylierung unter Pioglitazon-Behandlung. Dagegen konnten die Punkte A-E in weiteren Phosphoprotein-Färbungen nicht erneut dargestellt werden.

4.5 Massenspektrometrische Untersuchungen

Für die Bestimmung des Phosphorylierungs-regulierten Proteins wurden die Gele nach zweidimensionaler Gelelektrophorese mit Comassi gefärbt und das betreffende Protein aus dem Gel ausgeschnitten. Nach In-Gel-Verdau mit Trypsin erfolgte die Bestimmung der Proteinfragment-Größen mittels MALDI-TOF-Analyse, die so ermittelten Peptidgrößen wurden mit einer Protein-Datenbank (Matrixscience.com) verglichen. Das Ergebnis des Datenbank-Abgleichs ergab für den in 4.4 ermittelten Spot Zytokeratin 19 (siehe Abb. 4.28).



Match to: KRHU9

Score: 147

keratin 19, type I, cytoskeletal - human

Nominal mass (Mr): 44065; Calculated pI value: 5.04

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Peptide Mass Tolerance : ± 0.4 Da

Max Missed Cleavages : 0

Number of mass values searched: 10

Number of mass values matched: 9

Sequence Coverage: 23%

1 MTSYSYR **QSS ATSSFGGLGG GSVRFGPGVA FR** APSIHGGS GGRGVSVSSA
51 RFVSSSSSGG YGGGYGGVLT ASDGLLAGNE **KLTMQNLNDR** LASYLDKVRA
101 LEAANGELEV KIRDWYQKQG PGPSR **DYSHY YTTIQDLR** DK ILGATIENSR
151 IVLQIDNARL AADDFRTK **FE TEQALR** MSVE ADINGLRRVL DELTLARTDL
201 EMQIEGLKEE LAYLKK **NHEE EISTLR** GQVG GQVSVEVDSA PGTDLAKILS
251 DMR **SQYEVMA EQNRKDAEAW FTSR** TEELNR EVAGHTEQLQ MSRSEVTDLR
301 RTLQGLEIEL QSQLSMKAAL EDTLAETEAR FGAQLAHIQA LISGIEAQLG
351 DVRADSER **QN QEYQR** LMDIK SRLEQEIATY RSLLEGQEDH YNNLSASKVL
401

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
8 - 24	1554.88	1553.87	1553.74	0.13	0	R.QSSATSSFGGLGGGSVR.F
25 - 32	850.62	849.61	849.45	0.16	0	R.FGPGVAFR.A
82 - 90	1104.26	1103.25	1103.54	-0.29	0	K.LTMQNLNDR.L
126 - 138	1675.09	1674.08	1673.77	0.31	0	R.DYSHYYTTIQDLR.D
169 - 176	993.69	992.68	992.49	0.19	0	K.FETEQALR.M
217 - 226	1227.90	1226.89	1226.59	0.30	0	K.NHEEEISTLR.G
254 - 264	1354.93	1353.92	1353.60	0.32	0	R.SQYEVMAEQNR.K
266 - 274	1082.75	1081.74	1081.48	0.26	0	K.DAEAWFTSR.T
359 - 365	965.73	964.72	964.44	0.29	0	R.QNQEYQR.L

Abb. 4.28: Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse für den in 4.4 identifizierten Protein-Spot. Darstellung der Peptidgrößen und Abgleich mit der Datenbank. Protein scores größer als 76 sind significant ($p < 0.05$).

Die Bestätigung der durch die MALDI-TOF-Analyse erhaltenen Erkenntnisse erfolgte durch Western-Blot nach vorheriger zweidimensionaler Gelelektrophorese. Zur Lokalisation des relevanten Proteins erfolgte eine Färbung der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S und anschließend die Behandlung der Membran mit Zytokeratin 19 Antikörpern (Abb. 4.29).

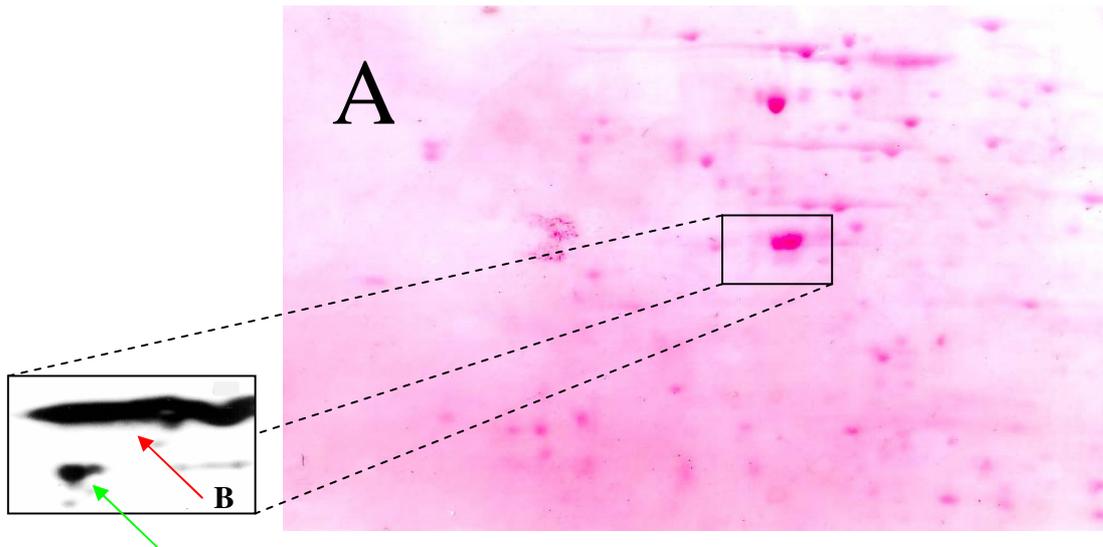


Abb. 4.29: Ponceau S-Färbung einer zweidimensionalen Western-Blots eines 72h-Gesamtproteinextraktes aus HCT-116 Zellen (A). Anschließend wurde die Membran mit Zytokeratin 19 Antikörpern behandelt (B).

Wie in Abb. 4.29 gezeigt, handelte es sich bei dem in der Silberfärbung und der Phosphoprotein-Färbung ermittelten Spot um Zytokeratin 19 (grüner Pfeil in Abb. 4.29B). Bei der über Zytokeratin 19 liegenden Bande handelt es sich um eine unspezifische Reaktion des verwendeten Antikörpers mit β -Aktin (roter Pfeil in Abb. 4.29B).

4.6 Wirkung von Pioglitazon auf die Phosphorylierung von Zytokeratin 19 in HCT-116 Zellen

Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten und sind wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts. Ihre Aufgabe besteht in der Gewährleistung der mechanischen Stabilität von Zellen. Hyperphosphorylierung von Zytokeratinen erhöht deren Löslichkeit und ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt¹⁰⁷. Des Weiteren spielen Zytokeratine bei der Reaktion der Zelle auf Stress und Apoptose eine bedeutende Rolle¹¹⁷.

Nach Inkubation von HCT-116 Zellen über unterschiedliche Zeiträume mit 40µM Pioglitazon wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und anschließend die Zytokeratin 19 (CK 19) Expression mittels Western-Blot untersucht. Hierbei ergab sich kein Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 4.30).

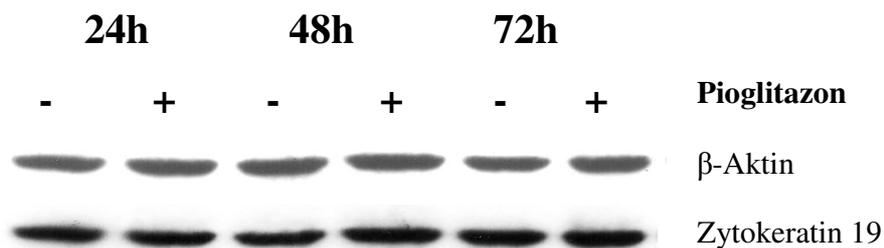


Abb. 4.30: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Zytokeratin 19. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40µM Pioglitazon inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen Zytokeratin 19 durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β-Aktin durchgeführt.

Da die Phosphoprotein-Färbung von Gesamtproteinextrakten HCT-116 Zellen die Vermutung nahe legte, dass Pioglitazon eine Hyperphosphorylierung von CK 19 bewirkt, wurde im Folgenden die Phosphorylierung von CK 19 untersucht. Hierzu wurden nach 24h, 48h und 72h Gesamtproteinextrakte von Kontrollzellen und mit 40µM Pioglitazon

behandelten Zellen hergestellt. Da keine Antikörper gegen phosphoryliertes Zytokeratin 19 existieren, musste zunächst eine Immunpräzipitation (I.P.) durchgeführt werden. Auf diese Weise isoliertes Zytokeratin 19 wurde anschließend mit Phospho-Tyrosin-Antikörpern (pTyr-AK) im Western-Blot und mittels Phosphoprotein-Färbung analysiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen stand nach der I.P. kein Aktin mehr zur Verfügung. Deswegen wurden die SDS-Gele nach dem Blotten mit Silber gefärbt und die so sichtbar gemachten, noch im Gel verbliebenen Proteine miteinander verglichen.

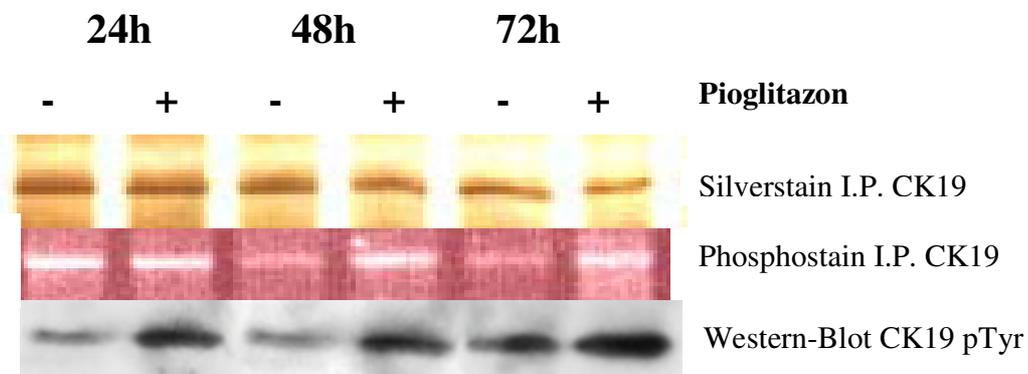


Abb. 4.31: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon bewirkt eine Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon inkubiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation von Zytokeratin 19 durchgeführt. So isoliertes Zytokeratin 19 wurde zunächst mit dem ProQ-Diamond Phosphoproteinstain behandelt (mittlere Reihe), und anschließend ein Western-Blot durchgeführt. Bei letzterem wurden Antikörpern gegen phospho-Tyrosin verwendet (untere Reihe). Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde eine Silberfärbung der noch im SDS-Gel verbliebenen Proteine durchgeführt (obere Reihe).

Wie in Abb. 4.31 dargestellt führte die Inkubation von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon zu einer deutlichen Erhöhung der Tyrosin-Phosphorylierung von Zytokeratin 19, wohingegen die Phosphorylierung in unbehandelten HCT-116 Zellen relativ gering ist.

4.6.1 Die Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19 ist PPAR- γ unabhängig

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von PPAR- γ durch Pioglitazon und der Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19 gibt, wurden HCT-116 Zellen mit 2 μ M des PPAR- γ Antagonisten GW9662 für eine Stunde vorbehandelt und anschließend über 24h, 48h und 72h mit 40 μ M Pioglitazon inkubiert. Analog zu den Ergebnissen unter 4.6 zeigte sich im Western-Blot keine Regulation von Zytokeratin 19 (Abb. 4.32), wohingegen die Hyperphosphorylierung sowohl in der Phosphoprotein-Färbung, als auch im Phospho-Thyrosin Western-Blot nach Gabe von GW9662 nachweisbar blieb (Abb. 4.33).

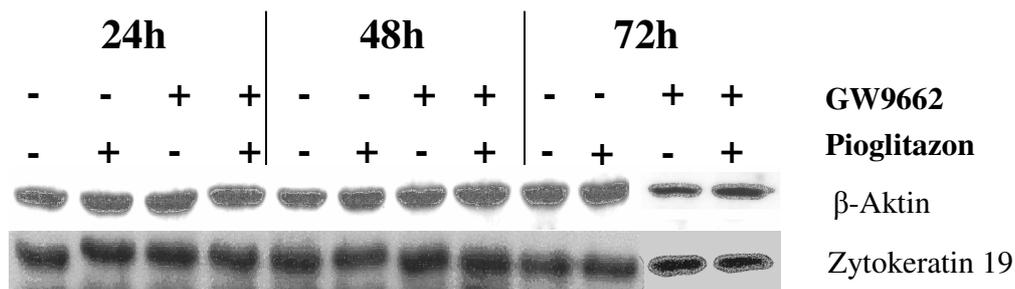


Abb. 4.32: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Pioglitazon und dem selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Zytokeratin 19. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon und mit und ohne 2 μ M GW9662 inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen Zytokeratin 19 durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β -Aktin durchgeführt.

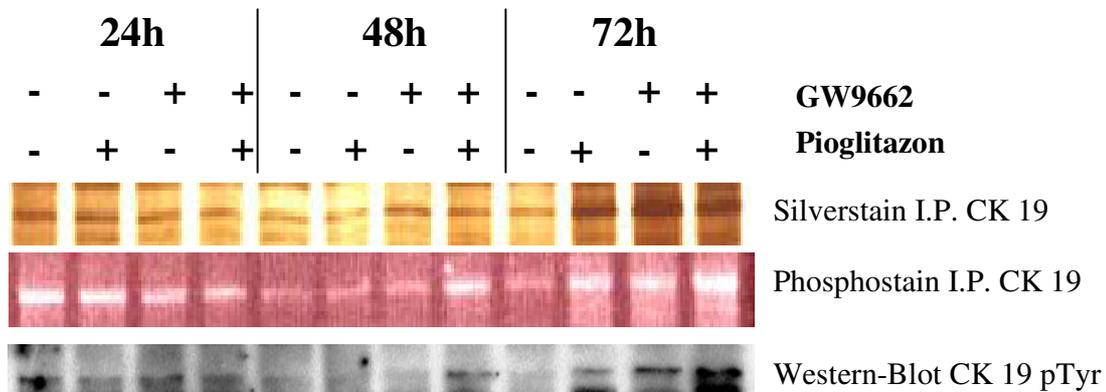


Abb. 4.33: Die Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19 unter der Behandlung mit Pioglitazon ist PPAR- γ unabhängig. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon und mit und ohne 2 μ M des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 inkubiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation von Zytokeratin 19 durchgeführt. So isoliertes Zytokeratin 19 wurde zunächst mit dem ProQ-Diamond Phosphoproteinstain behandelt (mittlere Reihe) und anschließend ein Western-Blot durchgeführt. Bei letzterem wurden Antikörpern gegen phospho-Tyrosin verwendet (untere Reihe). Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde eine Silberfärbung der noch im SDS-Gel verbliebenen Proteine durchgeführt (obere Reihe). Bei letzterer zeigte sich für die Bahn des 72h Kontroll-Proteinextraktes eine verminderte Menge an aufgetragenem Protein im Vergleich zu den anderen drei Bahnen nach 72h. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse nach 24h und 48h, sowie der Abb. 4.32 lässt sich dennoch eine Aussage über das Phosphorylierungsverhalten von Zytokeratin 19 nach Inkubation mit GW9662 machen.

4.7 Wirkung von Pioglitazon auf die Proteinexpression von pdcd4 in HCT-116 Zellen

In Studien konnte für das „programmed cell death 4“-Protein (pdc4) ein wachstumshemmender Effekt in Kolon- und Lungenkarzinom-Zellen⁵⁸ gezeigt werden. Dabei führte eine Überexpression von pdcd4 Zelllinien-abhängig zur Induktion von Apoptose^{2,156,192}, bzw. zu einer Beeinflussung Zellzyklus-regulierender Proteine wie cdk1, cdk4/6 p21^{cip1/waf1}^{158,81,87}. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die unter 4.3.1.1 identifizierten Veränderungen der Proteinexpression von cdk4, Cyclin D₃ und p21^{cip1/waf1} mit einer Regulation von pdcd4 einhergehen. Hierzu wurden HCT-116 Zellen über

unterschiedliche Zeiträume mit 40 μ M Pioglitazon behandelt und die pcd4-Proteinexpression im Western-Blot mit Hilfe von Antikörpern bestimmt. Während die pcd4-Expression in unbehandelten HCT-116 Zellen relativ hoch ist, führte die Behandlung der Zellen mit Pioglitazon zu einer zeitabhängigen Abnahme der Proteinexpression (Abb. 4.34A). Die Abhängigkeit dieser Veränderungen von PPAR- γ wurde mit Hilfe des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 untersucht. Hierbei wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und zusätzlich mit 2 μ g GW9662 inkubiert. Es zeigte sich, dass die Pioglitazon-vermittelte Erniedrigung von pcd4 durch Blockade von PPAR- γ nicht antagonisiert werden konnte. Vielmehr führte die Inkubation der Zellen mit GW9662 ebenfalls zu einer Runterregulation von pcd4 (Abb. 4.34B).

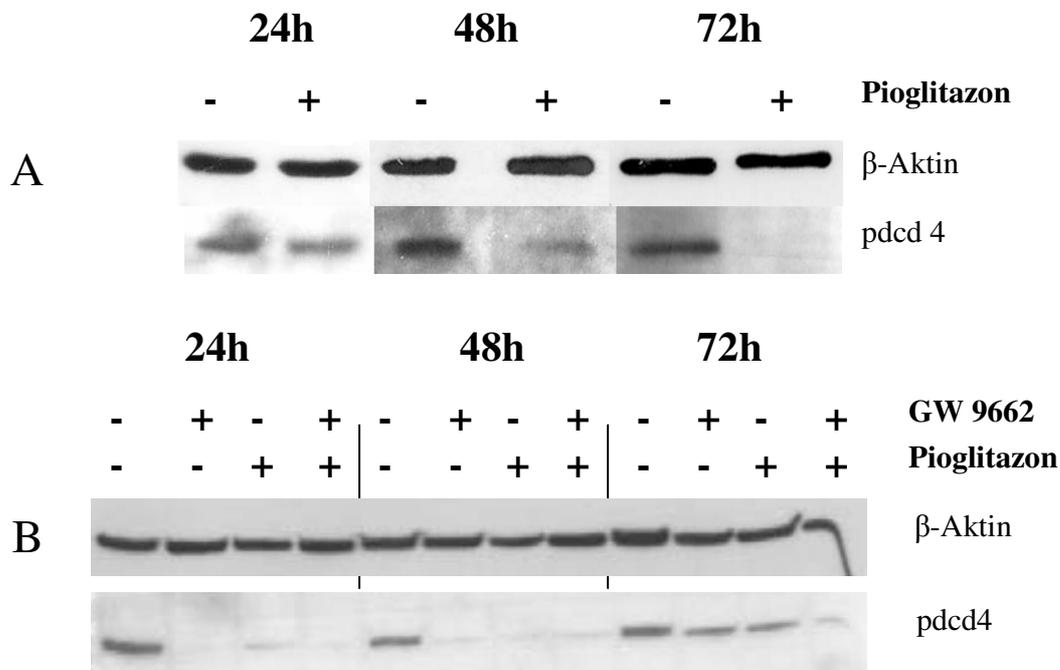


Abb. 4.34: Die Behandlung von HCT-116 Zellen mit bewirkt eine PPAR- γ -unabhängige Erniedrigung der Proteinexpression von pcd4. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden in An- und Abwesenheit von 40 μ M Pioglitazon (A), sowie in einem weiteren Experiment mit und ohne 2 μ M des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 (B) inkubiert und anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen pcd4 durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit Antikörpern gegen β -Aktin durchgeführt.

4.7.1 Die Transfektion von HCT-116 Zellen mit siRNA gegen pcdcd4 führt zu einer Wachstumshemmung

Durch die Transfektion von Zellen mit spezifischen siRNAs ist es möglich, selektiv die Expression von bestimmten Proteinen zu unterdrücken. Um die Frage zu beantworten, ob pcdcd4 einen Einfluss auf das Wachstum von HCT-116 Zellen hat, wurden die Zellen mit siRNA gegen pcdcd4 stabil transfiziert. Die Reduktion der pcdcd4 Proteinexpression ist in Abb. 4.35 dargestellt.

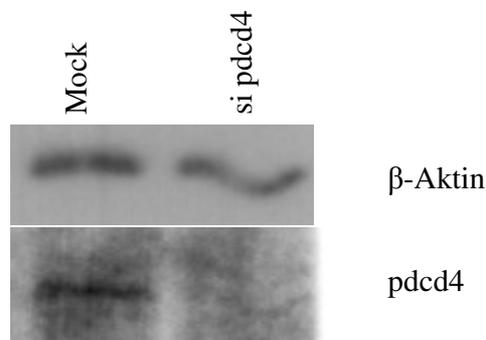


Abb. 4.35: Western-Blot mit Antikörpern, die gegen pcdcd4 gerichtet sind von Mock- und stabil mit pcdcd4-siRNA transfizierten HCT-116 Zellen. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde der Blot anschließend mit Antikörpern gegen β -Aktin behandelt.

Mittels MTT-Assay wurde jetzt das Wachstum der mit pcdcd4-siRNA behandelten Zellen mit dem von Mock-transfizierten Kontrollzellen nach 72h verglichen. Hier fand sich eine um ca. 20% reduzierte Zellzahl der si-transfizierten Klone im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.36).

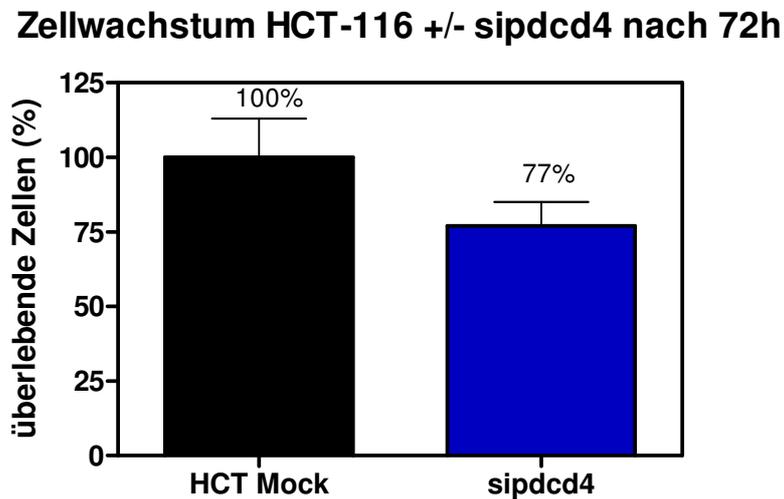


Abb. 4.36: Die Transfektion von HCT-116 Zellen mit siRNA gegen pcd4 bewirkt eine Wachstumshemmung. Die Zellen wurden stabil mit siRNA gegen pcd4 transfiziert und nach 72h das Wachstum mittels MTT-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen sowie die SD.

Wie aus den Abb. 4.36 ersichtlich, führt die Suppression von pcd4 durch siRNA, zu einer Erniedrigung des Zellwachstums auf 77% der Kontrollzellen nach 72 Stunden. Da in der Literatur pcd4 als Tumorsuppressor beschrieben wird, wurde zur Kontrolle dieses widersprüchlichen Ergebnisses die kodierende Sequenz des endogenen pcd4 hinsichtlich einer möglichen Mutation untersucht. Hierzu wurde Gesamt-mRNA aus HCT-116 Zellen isoliert und mittels RT-PCR cDNA für pcd4 hergestellt. Die so erhaltenen Proben wurden von GATC Biotech AG analysiert. Der Abgleich der ermittelten Sequenz für pcd4 mit einer elektronischen Internetdatenbank ergab an Stelle 143 den Austausch des Nukleotids Cytosin gegen Adenin, was zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Serin an Position 48 führt.

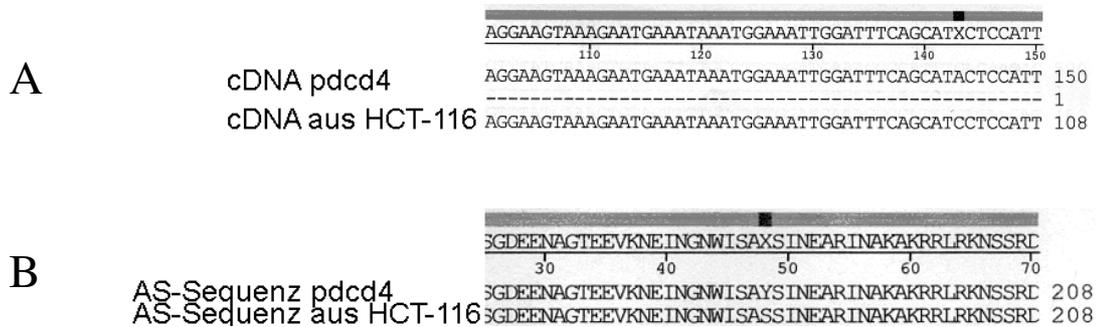


Abb. 4.37: Sequenzierung der pdcd4 cDNA aus HCT-116 und Abgleich mit der Datenbank (A, jeweils obere Reihe). Resultierende Aminosäure-(AS)-Sequenz (B).

Zur Kontrolle der detektierten Mutation wurde die Aminosäuresequenz aus HCT-116 Zellen zusätzlich mit der pdcd4 Aminosäuresequenz aus Leukozyten eines gesunden Spenders verglichen. Wie in Abb. 4.38 zu erkennen fand sich auch hier ein Austausch von Cytosin gegen Adenin an Position 143, so dass es sich bei der im Internet veröffentlichten Sequenz an dieser Stelle am ehesten um einen Fehler oder eine natürlich vorkommende Mutation handelt.

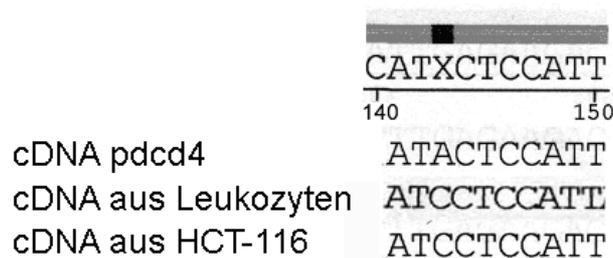


Abb. 4.38: Vergleich der Basensequenz von pdcd4 aus HCT-116 Zellen und human Leukozyten mit der Sequenz von pdcd4 aus der Datenbank.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Wirkung von Pioglitazon auf das Wachstum von HCT-116 und HT-29 Zellen

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms hat seit 1975 ständig zugenommen und ist heute mit über einer Millionen Neuerkrankungen der dritthäufigste Tumor weltweit. Obwohl sich die Prognose durch moderne Therapieverfahren gebessert hat¹⁷⁷, wird selten eine komplette Remission erreicht. Um die Heilungsraten des KRK zu verbessern sind deshalb ein Verständnis der Pathogenese sowie die Entwicklung neuer Therapieoptionen von entscheidender Bedeutung. Eine dieser neuen Therapiemöglichkeiten könnte die Aktivierung des „peroxisome proliferator activated rezeptor“ (PPAR) sein.

PPAR ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor^{82,102} und spielt eine bedeutende Rolle in vielen biologischen Prozessen, darunter Adipogenese, Glukosestoffwechsel, sowie die Regulation von Zellwachstum und -differenzierung^{21,141,164}. Bislang konnten drei PPAR-Subtypen identifiziert werden, nämlich PPAR α , β und γ , wobei sich diese in Bezug auf Lokalisation und Funktion unterscheiden. Unter diesen Subtypen ist PPAR- γ der am besten untersuchte Rezeptor. Er wird sowohl von natürlich vorkommenden Liganden, wie etwa 15-Desoxy-Delta-(12,14)-Prostaglandin J_2 aktiviert^{53,100}, als auch von synthetischen, wie den Thiazolidindionen (TZDs)¹⁴. TZDs, zu denen auch Pioglitazon gehört, umfassen eine Gruppe von Medikamenten, die ursprünglich zur Therapie des Diabetes Typ-II entwickelt wurden. In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass TZD über die Aktivierung von PPAR- γ nicht nur einen antidiabetischen, sondern ebenfalls einen antiproliferativen Effekt auf diverse Tumorzellen besitzt^{35,42,49,60,71}. Dieser wachstumshemmende Effekt war entweder bedingt durch die Induktion von Apoptose, Zellzyklus-Arrest oder durch die Induktion terminaler Differenzierung und konnte für Karzinome des Kolon¹⁴⁴, der Brust⁴², der Hypophyse⁷⁴, Pankreas¹²⁶ und Ösophagus⁷¹ nachgewiesen werden. Ausgehend von diesen Beobachtungen, dass TZDs einen wachstumshemmenden Effekt in diversen Karzinom-Zelllinien besitzt, stellte sich die Frage, ob und über welche Mechanismen die Behandlung von HCT-116 und HT-29 Zellen mit Pioglitazon zu einer Verminderung des Zellwachstums führt.

PPAR- γ wird in vielen Zelllinien exprimiert^{16,66}. Wie bereits für HT-29 Zellen geschehen⁶⁰, wurde zunächst die PPAR- γ Proteinexpression in HCT-116 nachgewiesen (Abb. 4.4). Die Behandlung mit Pioglitazon führte in beiden untersuchten Zelllinien zu einer Erniedrigung der Zellzahl im MTT-Assay (Abb. 4.1). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Kitamura et al. überein, in denen ein wachstumshemmender Effekt von Troglitazon auf unterschiedliche Kolonkarzinom-Zelllinien gezeigt werden konnte⁹⁸. Durch die Gabe des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW9662 konnte der inhibitorische Effekt von Pioglitazon auf die untersuchten Zelllinien antagonisiert werden (Abb. 4.6 und 4.7). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass der wachstumshemmende Effekt von Pioglitazon auf HCT-116 und HT-29 PPAR- γ vermittelt ist.

5.2 Wirkung von Pioglitazon auf den Zellzyklus von HCT-116 Zellen

Die verminderte Zellzahl nach Pioglitazon-Behandlung war begleitet von einer ebenfalls erniedrigten Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in den Mediumüberständen. LDH ist ein Enzym, welches beim Untergang von Zellen passiv an das Medium abgegeben wird, und kann somit als Marker für stattgefundenen Zelltod dienen. Die Erniedrigung der LDH-Aktivität unter Pioglitazon-Behandlung war ebenfalls PPAR- γ abhängig, und ließ vermuten, dass Pioglitazon seinen antiproliferativen Effekt auf die HCT-116 und HT-29 Zellen nicht über eine erhöhte Zellsterberate vermittelt (Abb. 4.8). Diese Annahme konnte durch durchflusszytometrische Untersuchungen der Zellzyklusverteilung für die HCT-116 Zellen bestätigt werden. Der Zellzyklus besteht aus mehreren Phasen: G₁-, S-, G₂- und M-Phase. Während der G₁-Phase bereitet sich die Zelle auf die Replikation der DNA vor, welche in der darauf folgenden S-Phase erfolgt. Der S-Phase folgt eine weitere Zwischen-Phase, die G₂-Phase, in der die Zelle auf die Mitose in der M-Phase vorbereitet wird. Vor der Replikation der DNA können Zellen in der G₁ in ein Ruhestadium übergehen, der G₀-Phase¹³⁰. Der Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste wird von verschiedenen zellulären Proteinen kontrolliert. Eine Schlüsselrolle hierbei nehmen die

Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks) ein, welche an bestimmten Punkten des Zellzyklus aktiviert werden (siehe Abb.5.1). Cdks alleine haben nur eine geringe katalytische Aktivität. Für ihre Aktivierung ist die Interaktion mit einer Gruppe von regulatorischen Proteinen, den Cyclinen notwendig. Wie auch bei den cdks werden für die verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedliche Cycline benötigt (Abb. 5.1).

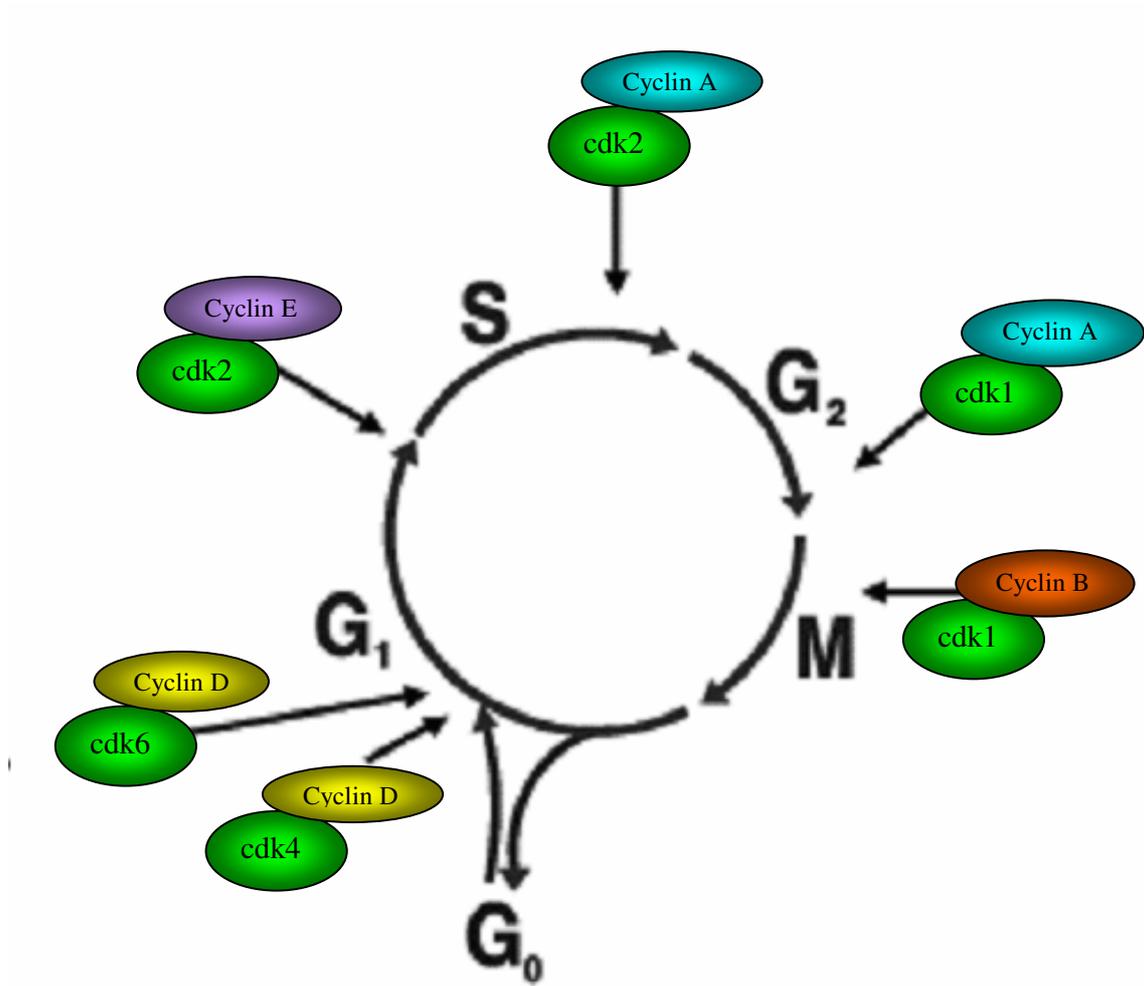


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Proteine Cyclin und cdk modifiziert nach Vermeulen et al. 2003¹⁷²

Weiterhin verfügt der Zellzyklus noch über mehrere so genannte „checkpoints“: Als Antwort auf eine Schädigung der DNA wird an diesen „checkpoints“ der Zellzyklus angehalten. Während dieser Phasen findet eine Reparatur der DNA statt. Solche Kontrollstellen finden sich vor der S-Phase (G₁/S-checkpoint), sowie nach der DNA-Replikation vor der M-Phase (G₂/M-checkpoint)⁷⁰.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR- γ durch spezifische Agonisten zu einem Arrest in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus führt. Die Art des Zellzyklus-Arrest war jeweils abhängig von dem verwendeten TZD sowie der Zelllinie^{54,104,185}. Aus diesem Grund wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Zellzyklusverteilung von HCT-116 Zellen mit und ohne Pioglitazon-Behandlung bestimmt wurde. Hier zeigte sich eine Erhöhung der Zellpopulation in der G₀/G₁-Phase um 10-15% unter Pioglitazon-Behandlung, welche eine Erniedrigung der Zellen in der S- und G₂/M-Phase zur Folge hatte (Abb. 4.10-4.12). Dieser G₀/G₁-Arrest war begleitet von einer Runterregulation von cdk4 und Cyclin D₃ im Western-Blot (Abb. 4.13 und 4.14).

Der durch Schäden an der DNA verursachte Zellzyklusarrest am G₁/S-checkpoint ist p53 abhängig¹¹⁴. Unter normalen Umständen ist die Proteinmenge an p53 in der Zelle relativ niedrig. DNA-Schädigung führt jedoch zu einer Induktion von p53, welches die Transkription unterschiedlicher Gene induziert, darunter Mdm2 Bax und p21^{cip1/waf1}. p21^{cip1/waf1} gehört zu den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI) und bewirkt über Inhibition der cdk's einen Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase^{103,155}. Bestimmungen der Proteinexpression über Western-Blot-Analysen ergaben in HCT-116 Zellen jedoch keine Regulation von p53 (Abb. 4.21), was vermuten lässt, dass die Behandlung der Zellen mit Pioglitazon nicht zu einer Stabilisierung des p53 Proteins führt. Dass Pioglitazon dennoch zu einer Schädigung der DNA führt zeigt die im Western-Blot detektierte proteolytische Aktivierung von PARP (Abb. 4.22), einem Protein, welches - abhängig vom Ausmaß der Schädigung - DNA-Reparaturenzyme aktiviert oder Apoptose der Zelle initiiert¹⁹.

Interessanterweise konnte auch eine Erniedrigung der Proteinmenge an p21^{cip1/waf1} unter der Wirkung von Pioglitazon nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen wie sie etwa in humanen myeloischen Leukämiezellen¹⁶¹

und Karzinoid-Zellen⁶⁰ gemacht wurden, bei denen die Aktivierung von PPAR- γ durch TZDs zu einer Induktion von p21^{cip1/waf1} führt. Eine mögliche Erklärung für die Erniedrigung der p21^{cip1/waf1} Proteinexpression in HCT-116 Zellen könnte die Interaktion von PPAR- γ mit dem anti-apoptotischen NF- κ B-Signalweg sein (siehe Abb.5.2). NF- κ B ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, welcher bei der Immunantwort und Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle spielt, aber auch einen Schutz vor Apoptose vermittelt^{10,162}. Die Aktivierung von NF- κ B führte im Mausmodell und in humanen Fibroblasten unter anderem zu einer Erhöhung der Proteinexpression von p21^{cip1/waf1}, p27¹¹⁰ und Cyclin D₁⁶⁹. Eine Verbindung des NF- κ B- und des PPAR- γ -Signalweges konnte von Chinetti et al. gezeigt werden, die eine Inhibition von p65/RelA, einer DNA-bindenden Untereinheit von NF- κ B, durch die Aktivierung von PPAR- γ in Makrophagen nachweisen konnte^{24,142}.

Somit könnte der in der FACS-Analyse beobachtete G₀/G₁-Arrest von mit Pioglitazon behandelten HCT-116 Zellen und die Runterregulation von cdk4 und Cyclin D₃ über eine PPAR- γ abhängige Inhibition der Untereinheit p65/RelA von NF κ B bedingt sein (siehe Abb.5.2).

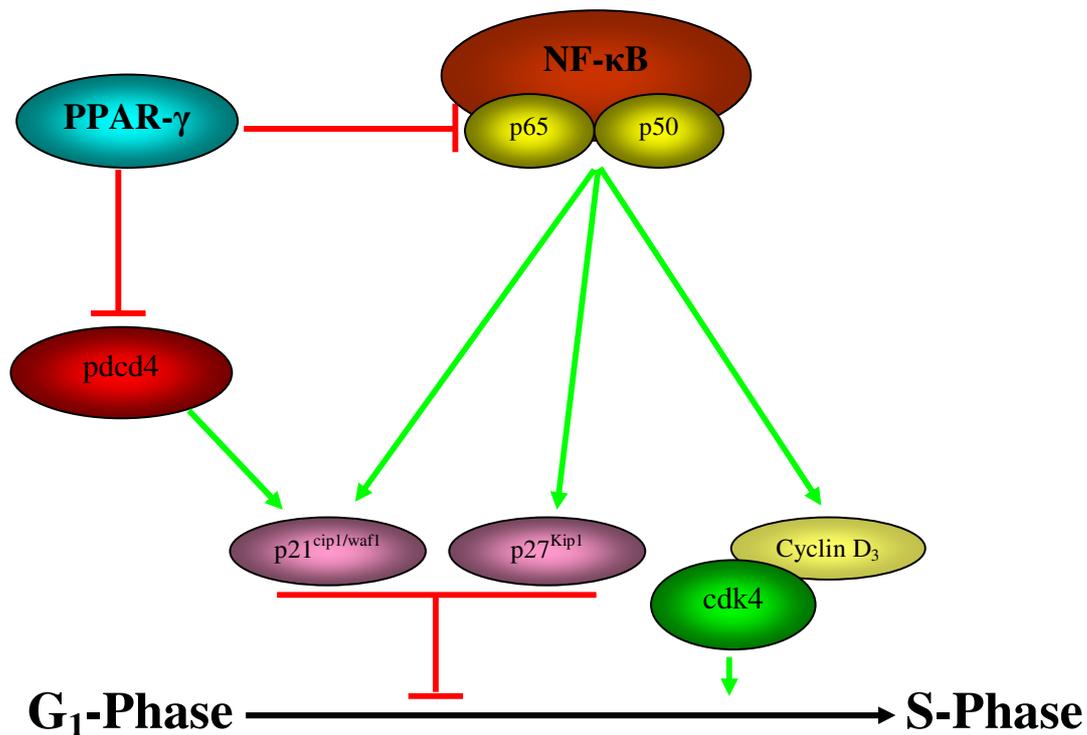


Abb. 5.2: Mögliche Interaktion von PPAR mit pcdcd4 und dem NF-κB-Signalweg

Ein weiteres Protein, für das ein Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose in Zellen nachgewiesen werden konnte, ist das „programmed cell death 4“-Protein (pcdcd4). Pcdcd4 ist ein Tumorsuppressor-Protein, welches seinen anti-proliferativen Effekt über zwei MA-3 Domänen entfaltet, wie sie auch in Translation-Initiationsfaktoren eIF4G I und eIF4G II vorkommen. MA-3 Domänen sind beteiligt an der Protein-Protein-Interaktion wodurch eIF4G in der Lage ist an eIF4A, einer ATP-abhängigen RNA-Helicase, zu binden und diese zu aktivieren¹⁴⁰. Pcdcd4 konkurriert mit eIF4G um die Bindung an eIF4A und führt so zu einer Hemmung der Translation, wodurch sich der antiproliferative Effekt von pcdcd4 ergibt^{57,187}. In neuroendokrinen Tumorzellen war eine erhöhte Expression von pcdcd4 verbunden mit einer Wachstumshemmung. Das verminderte Zellwachstum war begleitet von einer Verringerung der Expression von cdk4 und cdk6 und einer Erhöhung von p21^{cip1/waf1}¹⁶². Es stellte sich also die Frage, ob die in HCT-116 Zellen beobachtete Erniedrigung der cdk4-Expression mit einer Veränderung der pcdcd4-Proteinexpression in diesen Zellen einherging. In Western-Blot Analysen, bei denen Antikörper gegen pcdcd4

verwendet wurden, ergab sich eine Erniedrigung der Proteingesamtmenge an pcd4 unter der Behandlung mit Pioglitazon (Abb. 4.34). Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als dass eine verminderte Expression an pcd4 nach bisheriger Auffassung einen wachstumsfördernden Effekt haben müsste. Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch in anderen Karzinomzelllinien nachweisen lässt, wurde der Versuch mit Jurkat-Leukämiezellen wiederholt. Auch hier resultierte die Behandlung mit Pioglitazon in einer Erniedrigung der pcd4-Expression (Daten nicht gezeigt). Um die Rolle von pcd4 in HCT-116 Zellen weiter zu untersuchen wurden deswegen HCT-116 Zellen mit siRNA gegen pcd4 transfiziert. Die Effektivität der Transfektion wurde mittels Western-Blot Analyse überprüft, bei der Antikörper gegen pcd4 verwendet wurden (Abb. 4. 35). Hier ergab sich eine deutliche Erniedrigung der pcd4-Proteinexpression. Anschließend wurde das Zellwachstum dieser Klone mittels MTT-Assay untersucht (Abb. 4.36). Es zeigte sich eine moderate Wachstumshemmung der pcd4-siRNA Klone im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen um ca. 20% nach 72 Stunden. Die Erstellung einer cDNA von pcd4 und anschließende Sequenzierung konnte eine Mutation im Gen für pcd4 in HCT-116 ausschließen (Abb. 4.37 und 4.38). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass zum regelrechten Ablauf des Zellzyklus und damit zur Proliferation eine Schwellendosis an pcd4 vorhanden sein muss. Wird diese Menge unterschritten, resultiert das ebenso wie eine vermehrte Expression an pcd4 in einer Wachstumshemmung. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine Erniedrigung der pcd4-Proteinexpression durch PPAR- γ Agonisten beschrieben. Über welchen Mechanismus diese Interaktion erfolgt, muss in weiteren Experimenten genauer untersucht werden, da die regulatorischen Mechanismen der pcd4-Expression bislang noch nicht identifiziert werden konnten.

5.3 Wirkung von Pioglitazon auf das Apoptose-Verhalten von HCT-116 Zellen

Störungen im normalen Ablauf des Zellzyklus können Apoptose zur Folge haben. Neben dem G₀/G₁-Arrest könnte die beobachtete Inhibition des Zellwachstums der mit Pioglitazon

behandelten HCT-116 Zellen also auch durch Apoptose bedingt sein¹⁶³. Aus diesem Grund wurde die spezifische Apoptoserate in HCT-116 Zellen nach Behandlung mit Pioglitazon bestimmt. Hier ergab sich lediglich eine mässige Erhöhung der spezifischen Apoptose um 4-6% (Abb. 4.17). Auch in Western-Blot Analysen zeigte sich keine Regulation bzw. Aktivierung der pro-apoptotischen Enzyme Caspase 3, 10 und von p53. Lediglich für Caspase 9 konnte auf Proteinebene eine Regulation im Sinne einer Erniedrigung der Proteinexpression gefunden werden, was jedoch nicht auf die Aktivierung der Caspase zurückzuführen ist, da auch das 30kD große Spaltprodukt vermindert nachweisbar war (Abb. 4.18-4.21).

In einigen Studien führte die Aktivierung von PPAR- γ durch TZDs zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose. Dies konnte unter anderem für HT-29, Jurkat und NCI-H727 Zellen gezeigt werden^{59,60}. Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Frage nach der Wirkung von TRAIL in HCT-116 Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit Pioglitazon. Zunächst wurde die Empfindlichkeit der Zellen auf die durch TRAIL-vermittelte Apoptose untersucht. Hier ergab sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Inhibition des Zellwachstums (Abb. 4.23). Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit Pioglitazon zeigte dagegen nur einen additiven, und nicht -wie für HT-29, Jurkat⁵⁹ und NCI-H727 Karzinoid Zellen⁶⁰ beschrieben- einen synergistischen Effekt (Abb. 4.24 und 4.25). Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass die Verteilung der TRAIL-Rezeptoren auf der Oberfläche von HCT-116 sich zu der auf HT-29 oder Jurkat-Zellen unterscheidet. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren R1, R2 und auch R4 zu einer Aktivierung von NF- κ B führt^{30,120}, was eine vermehrte Expression von anti-apoptotischen Proteinen zu Folge hat¹⁷³. Eine erhöhte Rezeptordichte von TRAIL-R4 auf HCT-116 Zellen würde somit zu einer vermehrten Aktivierung von NF- κ B führen, und der durch TRAIL vermittelten Apoptose entgegenwirken. Für NCI-H727 Zellen konnte der Synergismus von TRAIL und Pioglitazon auf eine vermehrte Expression von p21^{cip1/waf1} zurückgeführt werden⁶⁰. Eine weitere mögliche Ursache für die im Vergleich zu den oben genannten Zellreihen verminderte Apoptoserate bei gleichzeitiger TRAIL und Pioglitazon-Inkubation in HCT-116 Zellen könnte somit die durch Pioglitazon vermittelte erniedrigte Proteinexpression von p21^{cip1/waf1} sein.

5.4 Wirkung von Pioglitazon auf die Phosphorylierung von Zytokeratin 19

Zytokeratine (CKs) gehören zu den Intermediärfilamenten und sind wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts. Ihre Aufgabe besteht in der Gewährleistung der mechanischen Stabilität von Zellen. Die Familie der Zytokeratine umfasst mehr als 50 verschiedene Mitglieder, welche in zwei Gruppen unterteilt werden^{76,124}. Typ I Keratine beinhalten CK 9-23, sowie die Haar-Keratine Ha1-Ha8. Zu den Typ II Keratinen gehören CK 1-8 und die Haar-Keratine Hb1-Hb6. Zur Ausbildung des Zytoskeletts lagert sich jeweils ein Typ I CK mit einem Typ II CK zusammen, so dass zwar die vorherrschenden CKs in den verschiedenen Geweben unterschiedlich sind, jedoch das Verhältnis von Typ I-CK zu Typ II-CK in jedem Gewebe 1 ergibt²⁷.

Die Phosphorylierung ist eine wichtige regulatorische Modifikation für die Funktion von Zytokeratinen^{132,193}. Es konnte gezeigt werden, dass es während der Interphase des Zellzyklus zu einer vermehrten Phosphorylierung von Zytokeratinen kommt, wodurch sich deren Löslichkeit erhöht. Darüber hinaus spielen Zytokeratine als Adapterproteine eine wichtige Rolle: Durch reversible Bindung von Proteinen bringen Zytokeratine diese in unmittelbare Nähe, so dass eine Reaktion erfolgen kann. Zum Beispiel führt die Phosphorylierung von CK 18 während der Mitose zu einer Bindung des 14-3-3 Proteins an CK 8/CK 18, was ein wesentlicher Mechanismus in der Organisation und Spaltung von Zytokeratinen darstellt¹⁰⁶. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Western-Blot Analyse konnte in HCT-116 Zellen eine Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19 nach Behandlung der Zellen mit Pioglitazon nachgewiesen werden, wohingegen die Phosphorylierung von CK 19 in unbehandelten HCT-116 Zellen relativ gering ist (Abb. 4.31-4.33). Über die Phosphorylierung von CK 19 ist noch relativ wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Behandlung mit PPAR- γ Agonisten zu einer Hyperphosphorylierung von CK 19 führt.

5.5 PPAR- γ Aktivierung als Therapieoption bei Tumoren

Die neoplastische Transformation von Zellen beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation, Apoptose und terminaler Differenzierung. Die Modulation dieser Prozesse mittels Bindung von Liganden an nukleäre Hormonrezeptoren stellt eine neue therapeutische Möglichkeit bei der Behandlung maligner Erkrankungen dar. PPAR- γ ist ein solcher Rezeptor. Es konnte nachgewiesen werden, dass seine Aktivierung zu einer Inhibition der Zellproliferation und/oder der Induktion von Apoptose führt^{42,60,71,74}, sowie Einfluss auf die terminale Differenzierung hat^{34,127,166}. Diese Beobachtungen gaben Anlass zu der Hoffnung, in der Aktivierung von PPAR- γ durch spezifische Liganden wie den TZDs eine wirksame Therapieoption für die Behandlung von Tumorerkrankungen gefunden zu haben.

Es folgten einige klinische Studien, in denen der antineoplastische Effekt von PPAR- γ Agonisten auf unterschiedliche Karzinomearten untersucht wurde, darunter Liposarkome^{29,166}, Prostatakarzinome^{79,128} und Karzinome der Brust²⁰. Letztere musste jedoch vorzeitig abgebrochen werden, da das in der Studie verwendete Troglitazon aufgrund seiner Hepatotoxizität vom Markt genommen wurde. Insgesamt kamen die Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen, wobei einige einen positiven Einfluss von PPAR- γ feststellen konnten^{79,128,166} andere jedoch nicht^{20,29}. Eine mögliche Ursache dieser gegensätzlichen Ergebnisse könnte sein, dass die meisten Studien, die eine Wirkung von PPAR- γ Aktivierung auf Zellzyklus, Apoptose und Differenzierung nachweisen konnten, in vitro unter Zellkulturbedingungen gewonnen wurden. Weitere Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser Studien ergaben sich daraus, dass vor der Behandlung mit PPAR- γ Agonisten nicht die Expression von PPAR- γ in den untersuchten Karzinomen bestimmt worden ist. Zudem war nicht sichergestellt, dass eine optimale Wirkkonzentration des oral verabreichten Medikaments erreicht wurde, da keine einheitlichen Medikamentendosierungen bestanden. Eine weitere mögliche Ursache dieser ambivalenten Resultate besteht darin, dass es sich in der Studie um Patienten mit bereits vorbehandelten Karzinomen handelte, bei denen die konventionelle Therapie versagt hatte. Um definitive Aussagen über die Wirksamkeit einer Therapie mit PPAR- γ Agonisten auf das Wachstum

von humanen Karzinomen in vivo machen zu können, ist demnach die Sicherstellung einer adäquaten Medikamentenkonzentration im Blut sowie die Überprüfung des PPAR- γ Status der Karzinome entscheidend. Eine Studie, die diese Überlegungen weitestgehend berücksichtigt, wurde 2007 von Yee et al. durchgeführt. Hier wurden 38 Frauen mit Brustkrebs in einem frühen Stadium über 2-6 Wochen mit 8mg Rosiglitazon behandelt. Diese Dosierung entsprach einer relativen Plasmakonzentration des Medikaments von 1,67 μ M/l und liegt damit an der unteren Grenze des Wirkungsbereiches von 1-10 μ M/l, wie es für Rosiglitazon beim Mamma-Karzinom in vitro ermittelt worden ist. Vor der Behandlung mit Rosiglitazon wurde der PPAR- γ Status der Karzinome ermittelt, die Ansprechbarkeit auf die Behandlung wurde mittels der Expression von Ki67 ermittelt, einem nukleären Protein, welches von proliferierenden Zellen exprimiert wird. Auch in dieser Studie ergab sich kein Vorteil aus der Vorbehandlung mit dem PPAR- γ Agonisten Rosiglitazon¹⁸⁹.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Wirkung von TZDs auf Tumorzellen abhängig von unterschiedlichen Faktoren ist, wie etwa der Zelllinie und der verwendeten Konzentration. Die Daten dieser Doktorarbeit zeigen eine mögliche Rolle von PPAR- γ Agonisten bei der Behandlung von kolorektalen Karzinomen. Trotz noch bestehender Schwierigkeiten in der Übertragung der in vitro Ergebnisse in vivo zeigt sich doch, dass die Aktivierung von PPAR- γ zukünftig eine mögliche Therapieoption bei der Behandlung von Neoplasien darstellt. Ob TZDs in Zukunft eine Rolle in der antineoplastischen Therapie spielen, muss jedoch in weiteren Studien gezeigt werden. Hierbei wäre es zudem interessant zu erfahren, ob durch die Kombination von PPAR- γ Agonisten mit üblichen antineoplastischen Therapieschemata wie Bestrahlung und Chemotherapie eine effektivere Wachstumshemmung von Karzinomen erreicht werden kann. In dieser und auch in anderen Arbeiten^{59,60} konnte ein sensibilisierender Effekt von Pioglitazon auf die durch TRAIL induzierte Apoptose gezeigt werden, so dass auch die Kombination von TZDs mit rekombinantem TRAIL als Therapieoption denkbar ist. Wenn es also gelingt, die Bedingungen der Zellkultur in klinischen Studien umzusetzen, könnte die Behandlung von humanen Karzinomen mit PPAR- γ Agonisten tatsächlich eine wirksame Ergänzung oder Alternative zur den bisherigen konventionellen Therapieschemata darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A. & Chatterjee, V.K. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J. Biol Chem.* **272**, 5128-5132 (1997).
2. Afonja, O., Juste, D., Das, S., Matsushashi, S. & Samuels, H.H. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene* **23**, 8135-8145 (2004).
3. Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. & Stark, G.R. The p53 network. *J. Biol Chem.* **273**, 1-4 (1998).
4. Alarcon, d.l.L., Sanchez-Fidalgo, S., Villegas, I. & Motilva, V. New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Curr. Pharm. Des* **10**, 3505-3524 (2004).
5. Amri, E.Z., Bonino, F., Ailhaud, G., Abumrad, N.A. & Grimaldi, P.A. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Biol Chem.* **270**, 2367-2371 (1995).
6. Appella, E. & Anderson, C.W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem* **268**, 2764-2772 (2001).
7. Arellano, M. & Moreno, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem Cell Biol* **29**, 559-573 (1997).
8. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
9. Ashkenazi, A. *et al.* Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest* **104**, 155-162 (1999).
10. Baeuerle, P.A. & Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179 (1994).
11. Bastie, C., Luquet, S., Holst, D., Jehl-Pietri, C. & Grimaldi, P.A. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. *J. Biol Chem.* **275**, 38768-38773 (2000).

12. Beamer,B.A. *et al.* Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. *Biochem Biophys Res. Commun.* **233**, 756-759 (1997).
13. Belka,C. *et al.* Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* **20**, 2190-2196 (2001).
14. Berger,J. *et al.* Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology* **137**, 4189-4195 (1996).
15. Bertz J,G.K. Krebs in Deutschland. 2006. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Saarbrücken.
16. Braissant,O., Fougelle,F., Scotto,C., Dauca,M. & Wahli,W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354-366 (1996).
17. Braissant,O., Fougelle,F., Scotto,C., Dauca,M. & Wahli,W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354-366 (1996).
18. Burkle,A. PARP-1: a regulator of genomic stability linked with mammalian longevity. *Chembiochem.* **2**, 725-728 (2001).
19. Burkle,A. PARP-1: a regulator of genomic stability linked with mammalian longevity. *Chembiochem.* **2**, 725-728 (2001).
20. Burstein,H.J. *et al.* Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.* **79**, 391-397 (2003).
21. Camp,H.S., Ren,D. & Leff,T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* **8**, 442-447 (2002).
22. Chaffer,C.L., Thomas,D.M., Thompson,E.W. & Williams,E.D. PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC. Cancer* **6**, 53 (2006).
23. Cheng,E.H. *et al.* Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**, 1966-1968 (1997).

24. Chinetti,G. *et al.* Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol Chem.* **273**, 25573-25580 (1998).
25. Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Tewari,M. & Dixit,V.M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
26. Clem,R.J. *et al.* Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 554-559 (1998).
27. Coulombe,P.A. & Omary,M.B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol* **14**, 110-122 (2002).
28. Danial,N.N. & Korsmeyer,S.J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219 (2004).
29. Debrock,G. *et al.* A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br. J. Cancer* **89**, 1409-1412 (2003).
30. Degli-Esposti,M.A. *et al.* The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* **7**, 813-820 (1997).
31. Degli-Esposti,M.A. *et al.* The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* **7**, 813-820 (1997).
32. Degli-Esposti,M.A. *et al.* Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* **186**, 1165-1170 (1997).
33. Degli-Esposti,M.A. *et al.* Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* **186**, 1165-1170 (1997).
34. Demetri,G.D. *et al.* Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3951-3956 (1999).
35. Demetri,G.D. *et al.* Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3951-3956 (1999).

36. Desvergne,B. & Wahli,W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **20**, 649-688 (1999).
37. Desvergne,B.a.W.W. Inducible Gene Expression. Baeuerle,P.A. (ed.), pp. 142-176 Boston,1995).
38. Dreyer,C. *et al.* Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68**, 879-887 (1992).
39. Dubuquoy,L. *et al.* Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* **360**, 1410-1418 (2002).
40. Dulic,V. *et al.* p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-1023 (1994).
41. El Deiry,W.S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825 (1993).
42. Elstner,E. *et al.* Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 8806-8811 (1998).
43. Emery,J.G. *et al.* Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol Chem.* **273**, 14363-14367 (1998).
44. Emery,J.G. *et al.* Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol Chem.* **273**, 14363-14367 (1998).
45. Escher,P. *et al.* Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* **142**, 4195-4202 (2001).
46. Escher,P. & Wahli,W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res.* **448**, 121-138 (2000).
47. Fajas,L., Fruchart,J.C. & Auwerx,J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* **438**, 55-60 (1998).
48. Falschlehner,C., Emmerich,C.H., Gerlach,B. & Walczak,H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int. J. Biochem Cell Biol* **39**, 1462-1475 (2007).
49. Fauconnet,S. *et al.* Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J. Biol Chem.* **277**, 23534-23543 (2002).

50. Fearon,E.R. & Vogelstein,B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
51. Fearon,E.R. & Vogelstein,B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
52. Feinstein,D.L. *et al.* Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key? *Biochem Pharmacol.* **70**, 177-188 (2005).
53. Forman,B.M. *et al.* 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812 (1995).
54. Fujii,D., Yoshida,K., Tanabe,K., Hihara,J. & Toge,T. The ligands of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma inhibit growth of human esophageal carcinoma cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Anticancer Res.* **24**, 1409-1416 (2004).
55. Fujiwara,T. & Horikoshi,H. Troglitazone and related compounds: therapeutic potential beyond diabetes. *Life Sci.* **67**, 2405-2416 (2000).
56. Ganten,T.M. *et al.* Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death. Differ.* **11 Suppl 1**, S86-S96 (2004).
57. Goke,A. *et al.* DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res. Commun.* **297**, 78-82 (2002).
58. Goke,R., Barth,P., Schmidt,A., Samans,B. & Lankat-Buttgereit,B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1). *Am. J. Physiol Cell Physiol* **287**, C1541-C1546 (2004).
59. Goke,R., Goke,A., Goke,B. & Chen,Y. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by transcription factors. *Cell Immunol.* **201**, 77-82 (2000).
60. Goke,R., Goke,A., Goke,B., El Deiry,W.S. & Chen,Y. Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1. *Digestion* **64**, 75-80 (2001).
61. Goke,R., Goke,A., Goke,B., El Deiry,W.S. & Chen,Y. Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1. *Digestion* **64**, 75-80 (2001).
62. Goke,R. *et al.* Programmed cell death protein 4 (PDCD4) acts as a tumor suppressor in neuroendocrine tumor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 220-221 (2004).

63. Gonzalez,F.J. The role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in peroxisome proliferation, physiological homeostasis, and chemical carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol* **422**, 109-125 (1997).
64. Gottlicher,M. *et al.* Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochem Pharmacol.* **46**, 2177-2184 (1993).
65. Green,D.R. & Reed,J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312 (1998).
66. Greene,M.E. *et al.* Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* **4**, 281-299 (1995).
67. Greene,M.E. *et al.* Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* **4**, 281-299 (1995).
68. Guan,Y.F., Zhang,Y.H., Breyer,R.M., Davis,L. & Breyer,M.D. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia.* **1**, 330-339 (1999).
69. Guttridge,D.C., Albanese,C., Reuther,J.Y., Pestell,R.G. & Baldwin,A.S., Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* **19**, 5785-5799 (1999).
70. Hartwell,L.H. & Weinert,T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634 (1989).
71. Hashimoto,Y. *et al.* Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* **39**, 2239-2246 (2003).
72. Hawk,E.T., Umar,A. & Viner,J.L. Colorectal cancer chemoprevention--an overview of the science. *Gastroenterology* **126**, 1423-1447 (2004).
73. Hayakawa,Y. *et al.* NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J. Immunol.* **172**, 123-129 (2004).
74. Heaney,A.P., Fernando,M. & Melmed,S. PPAR-gamma receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas. *J. Clin. Invest* **111**, 1381-1388 (2003).
75. Herold,G. Innere Medizin. Köln (2007).

76. Hesse,M., Magin,T.M. & Weber,K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J. Cell Sci.* **114**, 2569-2575 (2001).
77. Heyman,R.A. *et al.* 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397-406 (1992).
78. Hihi,A.K., Michalik,L. & Wahli,W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 790-798 (2002).
79. Hisatake,J.I. *et al.* Down-Regulation of prostate-specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Cancer Res.* **60**, 5494-5498 (2000).
80. Houseknecht,K.L., Cole,B.M. & Steele,P.J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest. Anim Endocrinol.* **22**, 1-23 (2002).
81. Hwang,S.K. *et al.* Aerosol-delivered programmed cell death 4 enhanced apoptosis, controlled cell cycle and suppressed AP-1 activity in the lungs of AP-1 luciferase reporter mice. *Gene Ther.* (2007).
82. Issemann,I. & Green,S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650 (1990).
83. Itami,A. *et al.* Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **94**, 370-376 (2001).
84. Janssen,E.M. *et al.* CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88-93 (2005).
85. Jehl-Pietri,C., Bastie,C., Gillot,I., Luquet,S. & Grimaldi,P.A. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta mediates the effects of long-chain fatty acids on post-confluent cell proliferation. *Biochem J.* **350 Pt 1**, 93-98 (2000).
86. Jemal,A. *et al.* Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* **54**, 8-29 (2004).
87. Jin,H. *et al.* Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol Cancer Ther.* **5**, 1041-1049 (2006).
88. Jo,M. *et al.* Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* **6**, 564-567 (2000).

89. Juge-Aubry, C. *et al.* DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J. Biol Chem.* **272**, 25252-25259 (1997).
90. Kamei, Y., Kawada, T., Kazuki, R. & Sugimoto, E. Retinoic acid receptor gamma 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J.* **293** (Pt 3), 807-812 (1993).
91. Kane, K.F., Langman, M.J. & Williams, G.R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and retinoid X receptor expression in human colorectal neoplasms. *Gut* **36**, 255-258 (1995).
92. Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Nau, M.M., Russell, E.K. & Lipkowitz, S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.* **59**, 734-741 (1999).
93. Keller, H. *et al.* Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 2160-2164 (1993).
94. Kielian, T. & Drew, P.D. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J. Neurosci. Res.* **71**, 315-325 (2003).
95. Kim, D.J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *J. Biol Chem.* **279**, 23719-23727 (2004).
96. Kim, K., Fisher, M.J., Xu, S.Q. & el Deiry, W.S. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **6**, 335-346 (2000).
97. Kischkel, F.C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579-5588 (1995).
98. Kitamura, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 75-80 (1999).
99. Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., Milburn, M.V. & Willson, T.M. The PPARs and PXR: nuclear xenobiotic receptors that define novel hormone signaling pathways. *Recent Prog. Horm. Res.* **54**, 345-367 (1999).
100. Kliewer, S.A. *et al.* A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-819 (1995).

101. Kliewer, S.A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 4318-4323 (1997).
102. Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. & Evans, R.M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771-774 (1992).
103. Ko, L.J. & Prives, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**, 1054-1072 (1996).
104. Kobuke, T., Tazuma, S., Hyogo, H. & Chayama, K. A Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits human cholangiocarcinoma cell growth: potential molecular targeting strategy for cholangioma. *Dig. Dis. Sci.* **51**, 1650-1657 (2006).
105. Kronborg, O., Fenger, C., Olsen, J., Jorgensen, O.D. & Sondergaard, O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* **348**, 1467-1471 (1996).
106. Ku, N.O., Liao, J. & Omary, M.B. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **17**, 1892-1906 (1998).
107. Ku, N.O., Michie, S., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L. & Omary, M.B. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 4373-4378 (2002).
108. Kubota, T. *et al.* Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **58**, 3344-3352 (1998).
109. Lawrence, D. *et al.* Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* **7**, 383-385 (2001).
110. Lee, M.Y., Heo, J.S. & Han, H.J. Dopamine regulates cell cycle regulatory proteins via cAMP, Ca(2+)/PKC, MAPKs, and NF-kappaB in mouse embryonic stem cells. *J. Cell Physiol* **208**, 399-406 (2006).
111. Lees, E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr. Opin. Cell Biol* **7**, 773-780 (1995).
112. Lehmann, J.M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol Chem.* **270**, 12953-12956 (1995).
113. Levin, A.A. *et al.* 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* **355**, 359-361 (1992).

114. Levine,A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331 (1997).
115. Li,H., Zhu,H., Xu,C.J. & Yuan,J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
116. Li,P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).
117. Liao,J., Ku,N.O. & Omary,M.B. Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J. Biol Chem.* **272**, 17565-17573 (1997).
118. Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C. & Wang,X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
119. Lynch,H.T. & de la,C.A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919-932 (2003).
120. MacFarlane,M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol. Lett.* **139**, 89-97 (2003).
121. Mangelsdorf,D.J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839 (1995).
122. Meng,R.D., McDonald,E.R., III, Sheikh,M.S., Fornace,A.J., Jr. & el Deiry,W.S. The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther.* **1**, 130-144 (2000).
123. Michalik,L., Desvergne,B., Basu-Modak,S., Tan,N.S. & Wahli,W. Nuclear hormone receptors and mouse skin homeostasis: implication of PPARbeta. *Horm. Res.* **54**, 263-268 (2000).
124. Moll,R., Franke,W.W., Schiller,D.L., Geiger,B. & Krepler,R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11-24 (1982).
125. Mori,S., Murakami-Mori,K., Nakamura,S., Ashkenazi,A. & Bonavida,B. Sensitization of AIDS-Kaposi's sarcoma cells to Apo-2 ligand-induced apoptosis by actinomycin D. *J. Immunol.* **162**, 5616-5623 (1999).
126. Motomura,W., Okumura,T., Takahashi,N., Obara,T. & Kohgo,Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell

- growth through the increase of p27^{KiP1} in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* **60**, 5558-5564 (2000).
127. Mueller, E. *et al.* Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* **1**, 465-470 (1998).
 128. Mueller, E. *et al.* Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 10990-10995 (2000).
 129. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
 130. Norbury, C. & Nurse, P. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem* **61**, 441-470 (1992).
 131. Oliver, R., III, Friday, E., Turturro, F., Lacy, A. & Welbourne, T. Troglitazone's rapid and sustained activation of ERK1/2 induces cellular acidosis in LLC-PK1-F+ cells: physiological responses. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **288**, F1257-F1266 (2005).
 132. Omary, M.B., Ku, N.O., Liao, J. & Price, D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell. Biochem* **31**, 105-140 (1998).
 133. Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, H.J. & Johnson, E.F. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J. Biol Chem.* **270**, 16114-16121 (1995).
 134. Pan, G. *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**, 815-818 (1997).
 135. Pan, G. *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**, 815-818 (1997).
 136. Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y.F. & Dixit, V.M. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.* **424**, 41-45 (1998).
 137. Pan, G. *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**, 111-113 (1997).
 138. Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F. & Krammer, P.H. The death receptors. *Results Probl. Cell Differ.* **23**, 25-63 (1999).
 139. Pitti, R.M. *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol Chem.* **271**, 12687-12690 (1996).
 140. Ponting, C.P. Novel eIF4G domain homologues linking mRNA translation with nonsense-mediated mRNA decay. *Trends Biochem Sci.* **25**, 423-426 (2000).

141. Rangwala,S.M. & Lazar,M.A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 331-336 (2004).
142. Ricote,M., Li,A.C., Willson,T.M., Kelly,C.J. & Glass,C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79-82 (1998).
143. Rumi,M.A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **84**, 1640-1647 (2001).
144. Sarraf,P. *et al.* Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.* **4**, 1046-1052 (1998).
145. Sato,H. *et al.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists. *Br. J. Cancer* **83**, 1394-1400 (2000).
146. Schmidt,A. *et al.* Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol.* **6**, 1634-1641 (1992).
147. Schoonjans,K., Martin,G., Staels,B. & Auwerx,J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**, 159-166 (1997).
148. Screaton,G.R. *et al.* TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol* **7**, 693-696 (1997).
149. Selby,J.V., Friedman,G.D., Quesenberry,C.P., Jr. & Weiss,N.S. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **326**, 653-657 (1992).
150. Shao,D. *et al.* Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* **396**, 377-380 (1998).
151. Sher,T., Yi,H.F., McBride,O.W. & Gonzalez,F.J. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* **32**, 5598-5604 (1993).
152. Sheridan,J.P. *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-821 (1997).
153. Sheridan,J.P. *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-821 (1997).

154. Sheridan, J.P. *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-821 (1997).
155. Sherr, C.J. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065 (1993).
156. Shibahara, K. *et al.* Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene* **166**, 297-301 (1995).
157. Simonet, W.S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
158. Smyth, M.J. *et al.* Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity*. **18**, 1-6 (2003).
159. Sprick, M.R. *et al.* FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*. **12**, 599-609 (2000).
160. Subbarayan, V. *et al.* RXRalpha overexpression in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy but fails to rescue myocardial hypoplasia in RXRalpha-null fetuses. *J. Clin. Invest* **105**, 387-394 (2000).
161. Sugimura, A. *et al.* Troglitazone suppresses cell growth of myeloid leukemia cell lines by induction of p21WAF1/CIP1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res. Commun.* **261**, 833-837 (1999).
162. Tak, P.P. & Firestein, G.S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest* **107**, 7-11 (2001).
163. Takahashi, N. *et al.* Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* **455**, 135-139 (1999).
164. Takashima, T. *et al.* PPAR-gamma ligands inhibit growth of human esophageal adenocarcinoma cells through induction of apoptosis, cell cycle arrest and reduction of ornithine decarboxylase activity. *Int. J. Oncol.* **19**, 465-471 (2001).
165. Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).
166. Tontonoz, P. *et al.* Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 237-241 (1997).
167. Tsubouchi, Y. *et al.* Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res. Commun.* **270**, 400-405 (2000).

168. Tsutsumi,T. *et al.* Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* **35**, 937-946 (2002).
169. Turturro,F., Friday,E., Fowler,R., Surie,D. & Welbourne,T. Troglitazone acts on cellular pH and DNA synthesis through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism in breast cancer-derived cell lines. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7022-7030 (2004).
170. Ulven,S.M. *et al.* Expression of retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtypes in rat liver cells: implications for retinoid signalling in parenchymal, endothelial, Kupffer and stellate cells. *Eur. J. Cell Biol* **77**, 111-116 (1998).
171. Varanasi,U. *et al.* Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J. Biol Chem.* **271**, 2147-2155 (1996).
172. Vermeulen, Van Bockstaele & Berneman. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131-149 (2003).
173. Wajant,H. TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam. Horm.* **67**, 101-132 (2004).
174. Walczak,H. *et al.* TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16**, 5386-5397 (1997).
175. Walczak,H. *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157-163 (1999).
176. Wang,X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-2933 (2001).
177. Waters & Cunninham. The changing face of chemotherapy in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* **84**, 1-7 (2001).
178. Weitz,J. *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* **365**, 153-165 (2005).
179. Welbourne,T., Friday,E., Fowler,R., Turturro,F. & Nissim,I. Troglitazone acts by PPARgamma and PPARgamma-independent pathways on LLC-PK1-F+ acid-base metabolism. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **286**, F100-F110 (2004).
180. Welbourne,T., Friday,E., Fowler,R., Turturro,F. & Nissim,I. Troglitazone acts by PPARgamma and PPARgamma-independent pathways on LLC-PK1-F+ acid-base metabolism. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **286**, F100-F110 (2004).

181. Wen,J. *et al.* Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* **96**, 3900-3906 (2000).
182. Wiley,S.R. *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. **3**, 673-682 (1995).
183. Wiley,S.R. *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. **3**, 673-682 (1995).
184. Wu,G.S. *et al.* KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* **17**, 141-143 (1997).
185. Yang,F.G. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 753-761 (2005).
186. Yang,F.G. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 753-761 (2005).
187. Yang,H.S. *et al.* The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* **23**, 26-37 (2003).
188. Yang,T. *et al.* Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am. J. Physiol* **277**, F966-F973 (1999).
189. Yee,L.D. *et al.* Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clin. Cancer Res.* **13**, 246-252 (2007).
190. Yoshikawa,T. *et al.* Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics* **35**, 637-638 (1996).
191. Zhang,B. *et al.* Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 7541-7545 (1992).
192. Zhang,H. *et al.* Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **25**, 6101-6112 (2006).
193. Zhou,X., Liao,J., Hu,L., Feng,L. & Omary,M.B. Characterization of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 19 and its role in filament organization. *J. Biol Chem.* **274**, 12861-12866 (1999).

Anhang

A Abkürzungen

A	Österreich
Abk.	Abkürzung
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Casp	Caspase
CH	Schweiz
CT	Computertomographie
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
engl.	englisch
FCS	Fetal Calf Serum
GB	Großbritannien
GER	Deutschland
HRP	Horse Radish Peroxidase
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
KRK	kolorektales Karzinom
LDH	Laktatdehydrogenase
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MAPK	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger Ribo-Nucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NaOH	Natrium Hydroxid
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR	Poly-Chain-Reaction
pdc4	programmed cell death 4
PG J ₂	15-Desoxy-Delta-(12,14)-Prostaglandin J ₂
PI	Propidiumiodid
PIO	Pioglitazon
PMSF	Pheylmehansulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisome proliferator response element
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RNA	Ribo-Nucleic Acid
RT	Raumtemperatur
RXR	retinoid X receptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TR	Thyroid-Rezeptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TZD	Thiozilidindion
UICC	Union International Contre le Cancer
USA	United States of America

B Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunden
kD	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampère
min	Minuten
ml	Milliliter
ml	Mikroliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
rpm	revolutions per minute
s	Nanometer
V	Volt

Zusammenfassung

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) hat seit 1975 ständig zugenommen und ist heute mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr der dritthäufigste Tumor weltweit. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung des KRK von entscheidender Bedeutung. Eine dieser neuen Therapiemöglichkeiten könnte die Aktivierung des „peroxisome proliferator activated rezeptor“ (PPAR) durch Thiazolidindionen (TZDs) darstellen. TZDs, zu denen auch Pioglitazon gehört, umfassen eine Gruppe von Medikamenten, die ursprünglich zur Therapie des Diabetes Typ-II entwickelt wurden. In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass TZDs über die Aktivierung von PPAR- γ nicht nur einen antidiabetischen, sondern ebenfalls einen antiproliferativen Effekt auf diverse Tumorzellen besitzen.

Um zu untersuchen, ob dies auch auf HCT-116 und HT-29 Zellen zutrifft, wurde zunächst die Expression von PPAR- γ in HCT-116 und HT-29 Zellen nachgewiesen. Die Inkubation der Zellen mit 40 μ M Pioglitazon führte in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion des Zellwachstums unter Pioglitazon-Behandlung. Dieser antiproliferative Effekt war verbunden mit einer Erniedrigung der LDH-Aktivität, einem Marker für stattgefundenen Zelltod. Sowohl Wachstumshemmung als auch die Erniedrigung der LDH-Aktivität waren durch Blockade von PPAR- γ mittels des selektiven Inhibitor GW9662 reversibel, wodurch die PPAR- γ -Abhängigkeit der Pioglitazon-Wirkung auf das Wachstum von HCT-116 und HT-29 Zellen bewiesen werden konnte. Passend zu diesen Ergebnissen ergaben durchflusszytometrische Untersuchungen von HCT-116 Zellen eine nur mäßig gesteigerte Apoptoserate, wohingegen der Zellzyklus eine Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase aufwies. Dieser G₀/G₁-Arrest hatte eine verminderte Proteinexpression der am Zellzyklus beteiligten Enzyme cdk4, Cyclin D₃ und p21^{cip1/waf1} zur Folge, wohingegen keine Regulation von pro-apoptischen Enzymen wie Caspase 3, 9, 10 und p53 zu beobachten war.

Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen der Pioglitazon-Wirkung und der TRAIL-vermittelten Apoptose zeigten in HT-29 Zellen einen synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Pioglitazon und TRAIL, welcher sich bei den

HCT-116 Zellen jedoch nicht nachweisen ließ. Interessanterweise fand sich unter Pioglitazon-Behandlung auch eine Erniedrigung der Proteinexpression von pcd4, einem Tumorsuppressor-Protein, welches über die Inhibition von eIF4A auf die Translation wirkt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR- γ einen Einfluss auf die Proteinexpression von pcd4 besitzt. Der gleiche Effekt konnte bei der Inkubation von Jurkat-Leukämiezellen mit 40 μ M Pioglitazon nachgewiesen werden. Die stabile Transfektion von HCT-116 Zellen mit siRNA gegen pcd4 resultierte ebenfalls in einer Wachstumshemmung, was die Vermutung nahe legt, dass ein basaler Proteinspiegel an pcd4 für den normalen Ablauf des Zellwachstums unerlässlich ist.

Zweidimensionale Gelelektrophoresen von HCT-116-Gesamtproteinextrakten zeigten eine Hyperphosphorylierung von Zytokeratin 19. Zytokeratine (CKs) gehören zu den Intermediärfilamenten und sind wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts. Die Phosphorylierung ist eine wichtige regulatorische Modifikation für die Funktion von Zytokeratinen und erhöht deren Löslichkeit. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Behandlung mit TZDs zu einer vermehrten Phosphorylierung von CK 19 führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon seinen wachstumshemmenden Effekt auf HCT-116 Zellen über die Erniedrigung der Proteinexpression von cdk4, Cyclin D₃ und p21^{cip1/waf1} vermittelt, was einen G₀/G₁-Arrest zur Folge hat. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Strategien für die Behandlung von Karzinomen stellt somit die Aktivierung von PPAR- γ über TZDs oder andere, noch effektivere Agonisten eine Erfolg versprechende Therapieoption dar.

Abstract

Colorectal cancer is a major global health problem with more than a million new cases diagnosed each year worldwide. The last decade has highlighted new advances in medical treatment of these carcinomas for example the activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) through specific ligands such as those belonging to the antidiabetic thiazolidinedione (TZD) class of compounds. Recent studies have demonstrated that binding on PPAR- γ leads to either terminal differentiation, inhibition of cell growth and/or apoptosis of a variety of cancers.

To determine whether PPAR- γ regulates the cell growth of the colorectal tumor cell lines HCT-116 and HT-29, the expression of PPAR- γ was verified using Western-Blot analysis. The incubation with 40 μ M pioglitazone resulted in a clear reduction of cell growth in both cell lines. This antiproliferative effect was accompanied by a decrease of LDH – a marker of proceeded cell death - in the supernatants. Both, reduction of cell-proliferation and LDH-activity in the supernatants were antagonized using the selective PPAR- γ antagonist GW9662, indicating that the effect of pioglitazone on HCT-116 and HT-29 cells depended on PPAR- γ activation. These results were confirmed by using flow cytometric analysis which showed only a moderate alteration of apoptotic cells under pioglitazone-treatment whilst the cells in the G₀/G₁-phase of the cell cycle was markedly increased. This G₀/G₁-arrest was accompanied by a reduction the protein levels of cdk4, Cyclin D₃ and p21^{cip1/waf1} in Western-Blot analysis. On the other hand pioglitazone had no effect on the protein levels of pro-apoptotic enzymes such as caspase 3, 9, 10 and p53.

In order to determine whether PPAR- γ plays any role in TRAIL-induced apoptosis of HCT-116 and HT-29 cells, the cells were pretreated with 40 μ M pioglitazone for either one or two days and afterwards their sensitivity to TRAIL-induced apoptosis was examined. TRAIL alone induced moderate apoptosis of these cells. The pretreatment of HT-29 cells with pioglitazone increased their sensitivity to TRAIL-induced apoptosis while in HCT-116 cells such a synergism could not be found. Interestingly, Western-Blot analysis showed a reduction of the protein level of the programmed cell death 4 protein (pdc4). Pdc4 is a tumoursuppressor protein that interacts with eIF4A thereby inhibiting translation. This report

demonstrates for the first time an interaction between the PPAR- γ signaling pathway and the expression of pcd4. To investigate if this effect can also be found in other tumors, Jurkat leukemia cells were incubated with 40 μ M pioglitazone and the protein level of pcd4 was measured by Western-Blot analysis showing a reduction of the pcd4 expression as well. The stable transfection of HCT-116 cells with siRNA against pcd4 showed marginal reduction of cell proliferation which led to the assumption that a minimal pcd4 level is essential for cell proliferation.

Two-dimensional gelelectrophoresis of HCT-116-protein extracts were performed showing a hyperphosphorylation of cytokeratin 19. The primary function of keratins is to protect epithelial cell from mechanical and chemical stresses and provide cell integrity. Phosphorylation is an important regulatory modification of keratins and improves their solubility. Hence, hyperphosphorylation plays a crucial role in filament organisation and reorganisation during mitosis and apoptosis. This report is the first to show that the treatment of cells with the PPAR- γ ligand pioglitazone leads to a hyperphosphorylation of cytokeratin 19.

In summary, this study shows that pioglitazone exerts its effect on HCT-116 cells via down-regulation of cdk4, Cyclin D₃ and p21^{cip1/waf1} leading to a G₀/G₁-arrest which depended on PPAR- γ . Confronted with the need to develop further strategies for the treatment of cancer, PPAR- γ agonists like TZDs or even more potent drugs seem to be a promising tool in anti-neoplastic therapy.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Harald Curth
 Geburtstag: 23.08.1980
 Geburtsort: Hamburg
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1987-07/2000	08/1987-07/1991:	Grundschule Brackel
	08/1991-07/1993:	Orientierungsstufe Hanstedt
	08/1993-07/2000:	Gymnasium Winsen/Luhe
	2000	Abitur

Studium:

10/2001-01/2006 **Humanmedizin** an der Philipps-Universität Marburg/Lahn
 Abschluss 05/2007 mit dem dritten Staatsexamen

Famulaturen/ praktisches Jahr

Famulaturen

02/2003-03/2003	Innere Medizin/Gastroenterologie allgem. Krankenhaus Hamburg/Harburg
02/2004- 03/2004	Innere Medizin/Infektiologie Universitätsklinikum Marburg/Lahn
08/2004- 09/2004	Praxis für Innere Medizin/Allgemeinmedizin Drs. Jepsen, Pellens, Schmidt, Hanstedt
03/2005	Zentrale Notaufnahme allgem. Krankenhaus Hamburg/Harburg

Praktisches Jahr

23.04.2006- 13.08.2006	Innere Medizin am Städtischen Klinikum Kassel
14.08.2006- 03.12.2006	Chirurgie am Städtischen Klinikum Kassel
04.12.2006- 28.01.2007	Neurologie/Paraplegiologie am Universitätsspital Balgrist/Zürich
29.01.2007- 25.03.2007	Neurologie am Städtischen Klinikum Kassel

Zusatzqualifikationen:

Seit 04/03	Dozententätigkeit für Biochemie bei „Medilearn – Medizinische Repetitorien“
Seit 06/03	Autorentätigkeit für den Medilearn-Verlag

Veröffentlichungen

- Harald Curth, Medilearn-Skriptenreihe: „Aminosäuren, Proteine und Enzyme“, Medilearn-Verlag (2007), ISBN: 3-938802-19-7
- Harald Curth, Medilearn-Skriptenreihe: „Kohlenhydrate“, Medilearn-Verlag (2007), ISBN 3-938802-20-0

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Aziz, Bacher, Barth, Basler, Bauer, Baum, Becker, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Bien, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Graul, Gress, Grimm, Griss, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Hamer, Happle, Hadewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellwig, Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Hilgermann, Hochban, Hörsch, Hofmann, Huffmann, Jacob, Jungclas, Kälble, Kaffarnik, Kann, Kern, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lammell, Lang, Lange, Lehmann, Legrum, Lengsfeld, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Lütcke, Maier, Maisch, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupp, Schachtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schlegel, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stiletto, Stinner, Stempel, Sturm, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Wichert v., Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Zielke.

In Kassel:

Neutzner, Faß, Feige, Ferbert, Gühne, Hoda, Hoffmann, Horst, Humaid, Kim, Klammer, Kuhn, Lattemann, Pausch, Raible, Schumacher, Spiller, von Dithfurth.

In Zürich:

Dietz, Marzaion, Schubert, Schurch

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte:

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Lankat-Buttgereit für die Vergabe dieses interessanten Themas meiner Doktorarbeit. Durch ihre Begeisterung für die Wissenschaft und ihre hervorragende Betreuung hat sie mir die Molekularbiologie näher gebracht und in mir die Freude an der Forschung geweckt. Ihr offenes Ohr für eigene Ideen hat mich stets dazu ermutigt, immer neue Fragen an mein Thema zu stellen. Danke Sascha.

An zweiter Stelle möchte ich mich bei Harald Schmidt bedanken. Er war mir - nicht nur was den technischen Ablauf und das Verständnis der durchgeführten Experimente anging - jederzeit eine große Hilfe. Insbesondere danke ich ihm für seine Geduld und die Unterstützung während des gesamten Zeitraumes dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Isabel und Elmar für die Hilfe bei der Bewältigung diverser Schwierigkeiten, die sich im Rahmen dieser Arbeit aufgetan haben. Dadurch dass wir zur gleichen Zeit ähnliche Probleme hatten fiel es mir leichter, auch kleinere Katastrophen beim Schreiben und bei den Experimenten zu überstehen.

Mein Dank gebührt natürlich auch meinen Mitdoktoranden Nadi, Steffi, Steffi, Doni, Lilian und Sabine, mit denen ich einige nächtliche und wochenendliche „Verabredungen“ in der Zellkultur hatte. Ohne euch wäre es weniger unterhaltsam gewesen. Danke auch an Jörg, mit dem ich einige interessante Gespräche im „Quod“ geführt habe. Nicht selten sind mir dabei neue Ideen gekommen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und jederzeit hinter mir gestanden haben.

Zuletzt möchte ich all den Freunden danken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet haben, die sich meine Probleme angehört und mich ertragen haben, sollte „mal“ ein Versuch nicht geklappt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Molekularbiologische Untersuchungen zum Wirkmechanismus des PPAR- γ Agonisten Pioglitazon auf die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT-116 und HT-29“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin unter Leitung von Prof. Dr. Gress in der Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie unter Leitung von Prof. Dr. Göke und Betreuung durch Prof. Dr. Lankat-Buttgereit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 30.10.2007