

**Signaltransduktionsmechanismen
in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach Behandlung
mit Fermentationslösungen funktioneller Kohlenhydrate
sowie Gemischen kurzkettiger Fettsäuren**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Kerstin Rebscher
aus Groß-Umstadt

2004

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Rechkemmer, TU München

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Paulsen, Universität Karlsruhe (TH)

Auszüge dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht bzw. präsentiert:

Abstracts:

Rebscher K., Barth S.W., Rechkemmer G. (2003): The influence of short-chain fatty acids on intracellular pH and calcium-concentration in the HT-29 colon carcinoma cell line. In: "Functional Food - Safety Aspects", Symposium. Reihe: Forschungsberichte (DFG), Senate Commission on Food Safety, SKLM (Hrsg.). Wiley-VCH, Weinheim, 2003, *in press*

Rebscher K., Barth S.W., Rechkemmer G. (2002): Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf die Regulation bedeutender zellulärer Parameter. *Proc. Germ. Nutr. Soc.*, **4**, 35

Posterbeiträge und Tagungen

Symposium der DFG Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit für Lebensmittel (SKLM): „Functional Food: Safety Aspects“, 05.-07.05.2002, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe:

Rebscher K., Barth S.W., Rechkemmer G. (2002): The influence of short-chain fatty acids on intracellular pH and calcium-concentration in the HT-29 colon carcinoma cell line.

39. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, 14.-15.03.2002, Jena:

Rebscher K., Barth S.W., Rechkemmer G.: Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf die Regulation bedeutender zellulärer Parameter.

Arbeitstagungen zum BMBF-Verbundprojekt "Molekulare und funktionelle Analytik von Kohlenhydratbestandteilen mit gesundheitsrelevanten Funktionen", 20.10.2000, Friedrichsdorf, 30.03.2001, Obrigheim und 01.-02.02.2002, Friedrichsdorf:

Rebscher K., Rechkemmer G.: Wirkung von Fermentationsüberständen und kurzkettigen Fettsäuregemischen auf die intrazellulären Parameter $[Ca^{2+}]_i$ und pH_i in HT-29-Zellen.

Meiner lieben Familie

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
III	TABELLENVERZEICHNIS	IX
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	Funktionelle Kohlenhydrate	3
2.2	Kurzkettige Fettsäuren	5
2.2.1	Bildung und Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren.....	5
2.2.2	Resorption und Transport von SCFA und Elektrolyten im Kolon	7
2.3	Der intrazelluläre pH-Wert (pH _i)	9
2.3.1	Regulationsmechanismen des pH _i	9
2.3.2	Bedeutung von pH _i -Änderungen für die Zelle	10
2.4	Die intrazelluläre Kalziumkonzentration [Ca ²⁺] _i	11
2.4.1	Bedeutung der [Ca ²⁺] _i	11
2.4.2	Regulation der [Ca ²⁺] _i	12
2.5	Grundlagen der Karzinogenese.....	14
2.5.1	Das Adenom-Karzinom-Modell.....	14
2.5.2	Bedeutung von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Karzinogenese	14
2.5.3	Bedeutungen von SCFA beim Kolonkarzinom.....	17
2.5.4	Bedeutung der MAP-Kinase-Kaskade beim Kolonkarzinom	19
2.6	Fragestellung.....	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Chemikalien und Geräte	23
3.2	Testsubstanzen	23
3.2.1	Fermentationsüberstände.....	23
3.2.1.1	<i>Gewinnung der Fermentationsüberstände.....</i>	<i>23</i>
3.2.1.2	<i>Bestimmung der SCFA-Konzentration der FÜ mittels Gaschromatographie ..</i>	<i>24</i>
3.2.2	SCFA-Gemische.....	24

3.3	Zellkultur.....	25
3.3.1	Die Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29.....	25
3.3.2	Aussaat für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente.....	26
3.3.3	Aussaat für die SDS-PAGE bzw. das Western Blotting von MAP-Kinasen.....	26
3.3.4	Aussaat für die RNA-Präparation zu Genexpressionsstudien.....	26
3.4	Ratiometrische Mikrospektrofluorimetrie zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ und des intrazellulären pH-Wertes (pH_i).....	27
3.4.1	Messprinzip mittels ionensensitiver Farbstoffe.....	27
3.4.2	Inkubation der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2 bzw. BCECF.....	30
3.4.3	Versuchsvorbereitung und Geräteaufbau.....	31
3.4.4	Versuchsablauf und Messintervalle.....	33
3.4.5	Kalibrierungen.....	34
3.4.5.1	<i>In vivo</i> Kalibrierung zur Bestimmung des pH_i	34
3.4.5.2	<i>In vitro</i> Kalibrierung zur Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$	35
3.4.6	Auswertung und Statistik.....	37
3.5	Bestimmung biogener Amine mittels Reversed Phase-HPLC.....	38
3.5.1	Probenaufarbeitung und Derivatisierungsreaktion.....	38
3.5.2	Kalibrierung mittels Aminstandards.....	39
3.5.3	Chromatographische Bedingungen.....	39
3.5.4	Lösungen zur Messung der Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$	40
3.6	Bestimmung der Endotoxinkonzentration mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test.....	40
3.6.1	Testprinzip.....	41
3.6.2	Kalibrierung und Auswertung.....	41
3.6.3	Lösungen zur Messung der Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$	42
3.7	Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen).....	42
3.7.1	Behandlung der Zellen und Probengewinnung.....	42
3.7.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
3.7.3	Western Blotting.....	43
3.7.4	Immunfärbung und Stripping der Membran.....	43
3.7.5	Nachweis der Protein-Banden und Auswertung.....	44

3.8	Expression ausgewählter Onkogene, Tumorsuppressorgene und Transkriptionsfaktoren.....	45
3.8.1	Behandlung der Zellen.....	45
3.8.2	RNA-Präparation aus HT-29-Zellen.....	46
3.8.3	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	46
3.8.4	RNA-Gelelektrophorese.....	47
3.8.5	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	48
3.8.6	DNA-Gelelektrophorese.....	50
3.8.6.1	Nachweis und Auswertung der Banden.....	50
3.8.6.2	Statistische Auswertung.....	50
4	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Effekte von Fermentationslösungen und SCFA-Gemischen auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$	51
4.1.1	Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Alkalisierung des pH_i durch Behandlung mit Fermentationsüberständen.....	53
4.1.2	Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) durch EIPA: Effekte auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Superfusion mit dem FÜ.....	57
4.1.3	Hemmung der FÜ-vermittelten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Ca^{2+} -freien Puffer und den Chelatbildner EGTA.....	60
4.1.4	Regulation von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Superfusion mit äquimolaren SCFA-Gemischen.....	63
4.1.5	EIPA-unabhängige Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch das SCFA-Gemisch bei inhibierter pH_i -Regulation.....	65
4.1.6	Inhibition des SCFA-vermittelten Ca^{2+} -Erhöhung durch Ca^{2+} -freie Lösungen und EGTA.....	67
4.2	Charakterisierung der FÜ-Zusammensetzung zur Klärung der divergierenden Ergebnisse zwischen FÜ und SCFA-Gemisch.....	69
4.2.1	Ermittlung der biogenen Amin-Konzentration.....	69
4.2.2	Effekte von biogenen Aminen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$	70
4.2.3	Gehalte mikrobieller Endotoxine.....	71
4.2.4	Effekte von Endotoxin auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$	71
4.2.5	Charakteristische pH_i -Veränderungen induziert durch das anaerobe Medium zur <i>in vitro</i> -Fermentation und Ammoniumsulfat.....	72
4.3	Aktivierung von MAP-Kinasen durch Butyrat.....	74

4.3.1	Effekte auf die SAPK/JNK-Aktivität	75
4.3.2	Effekte auf die p38-Aktivität	76
4.4	Expressionsänderung Kolonkrebs-relevanter Gene	76
4.4.1	Amplifikation der Transkriptionsfaktoren <i>c-myc</i> und <i>NF-κB</i>	77
4.4.2	Amplifikation des Transkriptionsfaktors <i>PCNA</i>	78
4.4.3	Amplifikation von <i>Cox-1</i> und <i>Cox-2</i>	79
4.4.4	Amplifikation von pro-apoptotisch wirkendem <i>Bax</i>	80
4.4.5	Amplifikation des anti-apoptotischen <i>Bcl-2</i>	81
5	DISKUSSION	83
5.1	Kombinierte Messmethode zur Bestimmung des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$	84
5.1.1	Methodenetablierung	85
5.1.2	Kalibrierungen	86
5.1.3	Vergleich der basalen Werte von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit der Literatur	87
5.2	Vergleichende Betrachtung der FÜ und SCFA-Gemische hinsichtlich ihrer Effekte auf die Änderung von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$	88
5.2.1	Zusammenhang zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und pH_i	88
5.2.2	Mechanismus zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$	92
5.3	Heterogene Zusammensetzung der FÜ	93
5.3.1	Biogene Amine und Endotoxine	93
5.3.2	Anaerobes Fermentationsmedium (AM) und Ammonium (NH_4^+)	95
5.4	Mögliche Zusammenhänge früher Signaltransduktionsmechanismen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29	97
5.4.1	Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden	98
5.4.2	SCFA-induzierte Regulation der Genexpression beim Kolonkarzinom	99
5.5	Übertragbarkeit auf die <i>in vivo</i> -Situation: Karzinomprävention durch Ballaststoffe?	101
6	LITERATURVERZEICHNIS	104
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	121
8	ANHANG	124
A	Lösungen	124
A.1	Zusammensetzung des anaeroben Phosphatpuffers zur <i>in vitro</i> -Fermentation von Oligosacchariden	124
A.2	Zusammensetzung der Ringer Lösung	124

A.3	Zusammensetzung des pH_i -Kalibrierpuffers	125
A.4	Lösungen für die SDS-PAGE und das Western Blotting	125
A.5	Lösungen für die RNA-Präparation, RT-PCR und DNA- bzw. RNA- Gelelektrophorese	126
B	Bedingungen für die GC zur Bestimmung der SCFA-Konzentrationen der FÜ	127
C	Messwerte der Versuchsreihen	128

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Physiologische Wirkungen von SCFA, im Besonderen Butyrat, und deren Bedeutung für das Kolonepithel.....	7
Abb. 2-2: Resorption von SCFA durch das Kolonepithel und deren Einfluss auf den Ionentransport im distalen und proximalen Kolon.....	8
Abb. 2-3: Zelluläre Regulation des pH_i der Kolonepithelzelle unter Berücksichtigung von Elektrolyttransport-blockierenden Substanzen	10
Abb. 2-4: Mechanismen zur Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Kolonepithelzelle	12
Abb. 2-5 Funktionen der Karzinom-assoziierten Gene im Zellzyklus einer normalen Zelle.....	15
Abb. 2-6 Entwicklungsphasen und genetische Veränderungen während der Kolonkarzinogenese nach der Adenom-Karzinom-Hypothese unter Berücksichtigung der postulierten Effekte von SCFA.....	17
Abb. 2-7 Mögliche Interaktion von Mechanismen der Signaltransduktion beim Kolonkarzinom.....	21
Abb. 3-1: Exzitationsspektren von Fura-2 für verschiedene freie Ca^{2+} -Konzentrationen und BCECF für verschiedene pH-Werte.....	28
Abb. 3-2: Darstellung des Ratio-Imaging-Prinzips anhand von „Pseudocolour“-Bildern einer Fura-2-Messung von HT-29-Zellen.	29
Abb. 3-3: Aufbau der Perfusionskammer FCS 2 zur Vorbereitung der Fluoreszenzmessungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und pH_i	32
Abb. 3-4: Formel zur Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$	35
Abb. 3-5: Fluoreszenz-Ratiowerte zur Kalibrierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mittels Ca^{2+} -haltiger Kalibrierlösungen	36
Abb. 3-6: Emissionsspektren von Ca^{2+} -freier und Ca^{2+} -gesättigter Kitlösung zur Ermittlung des S_f -Wertes.	36
Abb. 3-7: Doppeltlogarithmische Darstellung der Kalibrierwerte mit linearer Regression zur Bestimmung des K_d -Wertes.	37
Abb. 3-8: Derivatisierungsreaktion von Aminen mittels FMOC-Cl zu fluoreszierenden Karbamaten	38
Abb. 3-9: Beispiel eines mit Ethidiumbromid gefärbten RNA-Kontrollgels.....	47
Abb. 4-1 Effekte des Fermentationsüberstandes (1:2 verdünnt) auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$	54

Abb. 4-2	Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ im Zellverband während der Behandlung mit dem FÜ.....	55
Abb. 4-3	Vergleich von ΔpH_i und $\Delta [Ca^{2+}]_i$ zwischen dem FÜ (28,1 mmol/L SCFA) und dem FÜ „Kontrolle“ (7 mmol/L SCFA).....	56
Abb. 4-4	Effekte des Fermentationsüberstandes (1:2 verdünnt) versetzt mit EIPA (10 μ mol/L) auf den pH_i und die $[Ca^{2+}]_i$	58
Abb. 4-5	Vergleich der ΔpH_i -Änderungen nach Superfusion von HT-29-Zellen mit dem Fermentationsüberstand bzw. dem Fermentationsüberstand in Kombination mit der Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers (FÜ + EIPA 10 μ mol/L).....	59
Abb. 4-6	Effekte des Fermentationsüberstandes in Ca^{2+} -freiem Puffer (1:2 verdünnt) versetzt mit EGTA (2 mmol/L) auf den pH_i und die $[Ca^{2+}]_i$	61
Abb. 4-7	Vergleich der ΔpH_i -Änderungen nach Superfusion von HT-29-Zellen mit dem Fermentationsüberstand bzw. dem Fermentationsüberstand in Ca^{2+} -freier, EGTA-haltigem Puffer (FÜ + EGTA 2 mmol/L).....	62
Abb. 4-8	Effekte des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt) auf den pH_i und die $[Ca^{2+}]_i$	64
Abb. 4-9	Zusammenfassung der Effekte des SCFA-Gemisches analog dem FÜ „Kontrolle“ (1:2 verdünnt) auf die pH_i - und $[Ca^{2+}]_i$ -Werte vor und nach der Superfusion mit dem SCFA-Gemisch.	65
Abb. 4-10	Effekte des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt)+EIPA (10 μ mol/L) auf den pH_i und die $[Ca^{2+}]_i$	66
Abb. 4-11	Effekte des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt) in Ca^{2+} -freiem Puffer +EGTA (2 mmol/L) auf den pH_i und die $[Ca^{2+}]_i$	68
Abb. 4-12	Chromatogramme des Aminstandards 100 μ mol/L und des FÜ 1:2 verdünnt in 0,1 M HCl	70
Abb. 4-13	Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ während der Superfusion der Zellen mit E. coli-Endotoxin und Neurotensin.	72
Abb. 4-14	Graphischer Vergleich der Ratiowerte des pH_i und der $[Ca^{2+}]_i$ nach Behandlung mit dem FÜ, dem Anaerobiermedium (AM), dem mit SCFA-versetztem AM bzw. $(NH_4)_2SO_4$ (10 mmol/L).....	74
Abb. 4-15	Effekte von Butyrat (3 mmol/L) auf die Aktivität der SAPKinasen JNK 1 und 2 in HT-29-Zellen.....	75
Abb. 4-16	Effekte von Butyrat (3 mmol/L) auf die Aktivität der p38-MAPK in HT-29-Zellen.	76
Abb. 4-17	Expressionsänderungen bei den Transkriptionsfaktoren c-myc und NF- κ B in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat.	78

Abb. 4-18	Expressionsänderungen bei PCNA in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat.....	79
Abb. 4-19	Expressionsänderungen bei Cox-1 und Cox-2 in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat	80
Abb. 4-20	Expressionsänderungen beim pro-apoptotischen Bax in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat.....	81
Abb. 4-21	Expressionsänderungen beim anti-apoptotischen Bcl-2 in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat.....	82

III Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Struktur und Nomenklatur von SCFA	5
Tab. 2-2:	Aktivierungswege der MAPK-Kaskaden im Zytoplasma mit ihren möglichen Transkriptionsfaktoren im Zellkern.....	20
Tab. 3-1:	SCFA-Zusammensetzung des FÜ bzw. des FÜ „Kontrolle“ gemessen mittels GC.....	24
Tab. 3-2:	Exzitations- und Emissionswellenlängen zur ratiometrischen Messung von $[Ca^{2+}]_i$ bzw. pH_i	33
Tab. 3-3:	Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung der Aminderivate.....	40
Tab. 3-4:	Thermozyklerprogramm zur Durchführung der RT-PCR	49
Tab. 3-5:	Nukleotidsequenzen der jeweiligen Primerpaare zur Amplifizierung der aufgeführten Gene in der PCR.....	49
Tab. 4-1:	Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-1. Fermentationsüberstand (FÜ) 1:2 verdünnt in Messpuffer.....	53
Tab. 4-2:	Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-4. Fermentationsüberstand (FÜ) 1:2 verdünnt in Messpuffer, versetzt mit EIPA (10 μ mol/L).....	57
Tab. 4-3:	Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-6. Fermentationsüberstand (FÜ) 1:2 verdünnt in Ca^{2+} -freiem Messpuffer + EGTA (2 mmol/L).....	60
Tab. 4-4:	Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-8. SCFA-Gemisch 1:2 verdünnt in Messpuffer	63
Tab. 4-5:	Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-10. SCFA-Gemisch 1:2 verdünnt in Messpuffer, versetzt mit EIPA (10 μ mol/L).....	65
Tab. 4-6:	Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-11. SCFA- Gemisch 1:2 verdünnt in Ca^{2+} -freiem Messpuffer, versetzt mit EGTA (2 mmol/L).	67
Tab. 4-7:	Aminkonzentrationen der Fermentationsüberstände [μ g/mL].....	70
Tab. 4-8:	Endotoxingehalt (MW) der Fermentationsüberstände [EU/mL].....	71

1 Zusammenfassung

Neuartigen, funktionellen Kohlenhydraten wird eine große Bedeutung bei der Prävention kolorektaler Karzinome beigemessen. Die Wirkung auf das Kolonepithel wird dabei von den aus ihrer Fermentation resultierenden kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) vermittelt. Diesen SCFA werden Effekte in verschiedenen Abschnitten der Zellzykluskontrolle, der Proliferation und der Apoptose zugesprochen. Die zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion, über die präventive Effekte moduliert werden können sind dabei von besonderer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde mittels Mikrospektrofluorimetrie untersucht, welche Effekte *in-vitro*-Fermentationslösungen (FÜ) und äquimolare SCFA-Gemische auf den intrazellulären pH-Wert (pH_i) und die damit eng verbundene intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 ausüben.

Es zeigte sich, dass die FÜ ihre Wirkung zunächst über eine Alkalisierung des pH_i und eine damit verbundene Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermitteln. Die sich anschließende starke Azidifizierung des Zytoplasmas führte zu einer Erniedrigung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diese war unabhängig von der Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers durch EIPA. Der SCFA-induzierte, langsame Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war zeitlich mit der Azidifizierung des Zytoplasmas verbunden. Eine Inkubation mit EIPA konnte die Regulation des pH_i nach der Azidifizierung völlig inhibieren, die Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieben davon jedoch unbeeinflusst. Nach Beenden der Superfusion der Zellen mit den SCFA-Gemischen, traten charakteristische „overshoots“ des pH_i als auch der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf. Diese wurden durch die Verwendung des Komplexbildners EGTA unterbunden. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte sowohl bei den FÜ als auch den SCFA-Gemischen nach Kontrollversuchen mit EGTA auf einen Einstrom extrazellulär vorhandener Ca^{2+} -Ionen zurückgeführt werden. Die stark divergierenden Antwortmuster der HT-29-Zellen auf die FÜ, respektive die SCFA-Gemische, wurden mit dem Ammoniumgehalt der FÜ in Zusammenhang gebracht.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte anhand molekularbiologischer Untersuchungen mit der Einzelfettsäure Butyrat mögliche Signalwege charakterisiert werden, die nach den Veränderungen von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an der Signalweiterleitung beteiligt sein können.

Hierzu wurden die Signalwege der MAP-Kinasen p38 und SAPK/JNK untersucht. Während die p38-Kinase durch eine Butyratinkubation nicht phosphoryliert werden

konnte, induzierte eine 8-stündige Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat die Aktivierung von SAPK/JNK.

Des Weiteren wurden sieben Gene, die an der Zellzykluskontrolle, Proliferation bzw. Apoptoseinduktion beteiligt sind mittels RT-PCR und Gelelektrophorese auf ihre Expression nach Butyratbehandlung untersucht. Während die mRNA-Spiegel von *c-myc*, *Cox-1*, *Cox-2* und *NF-κB* durch 3 mmol/L Butyrat bei keiner der Inkubationszeiten signifikant beeinflusst wurden, konnte eine signifikante Reduktion der exprimierten mRNA-Menge des Transkriptionsfaktors *PCNA* nach 24-stündiger Behandlungszeit nachgewiesen werden. Für *Bax* wurde tendenziell eine erhöhte Expressionsrate an mRNA nach 1-, 3- bzw. 24-stündiger Behandlungszeit beobachtet, die jedoch nicht signifikant war.

Für das *Bcl-2* konnten nach der Elektrophorese keine Transkripte nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass das Gen in HT-29-Zellen nicht exprimiert wird.

Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen darauf hin, dass die präventiven Eigenschaften von Butyrat auf die Karzinogenese über den Signalweg der MAP-Kinase SAPK/JNK vermittelt werden könnte. An der Signaltransduktion ist der Transkriptionsfaktor *PCNA* beteiligt, auch für das pro-apoptotische *Bax* ist eine Beteiligung in Betracht zu ziehen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Fermentationsüberstände als auch die kurzkettigen Fettsäuren Effekte auf verschiedene frühe Mechanismen der Signaltransduktion in HT-29-Zellen ausüben. Der Beitrag zur Beeinflussung der Promotion bzw. Progression der Karzinogenese muss jedoch weiter kontrovers diskutiert werden.

2 Einleitung

2.1 Funktionelle Kohlenhydrate

In den letzten Jahrzehnten stieg die Erkrankungshäufigkeit für bestimmte Formen des humanen Kolorektalkarzinoms in westlichen Industriestaaten drastisch an. Die Tumore von Kolon und Rektum stellen nach dem Lungenkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen, eine sehr hohe Krebsmortalität mit jährlich mehreren tausend Todesfällen (Fodde 2002). Das IARC¹ dokumentiert für das Jahr 2000 in Deutschland folgende Mortalitätsraten beim Kolorektalkarzinome: Frauen mehr als 17.300 und Männer über 14.900 Fälle (IARC, 2003).

Eine Vielzahl experimenteller und epidemiologischer Studien der letzten Jahrzehnte misst u.a. auch den Ernährungsgewohnheiten bzw. einzelnen Nahrungsbestandteilen große Bedeutung bei der Entwicklung, respektive der Prävention, kolorektaler Karzinome bei. Der tägliche Verzehr von Obst und Gemüse mit Kombinationen zahlreicher protektiver Inhaltsstoffe, zu denen auch Ballaststoffe und komplexe Kohlenhydrate zählen, wirkt sich dabei risikomindernd aus, während ein erhöhter Fett- und Alkoholkonsum das Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms fördern (Kim und Mason 1996).

Seit der Einführung „funktioneller Lebensmittel“ („*functional food*“) Mitte der 90er Jahre, gewannen Nahrungsmittel mit gesundheitsrelevanten Inhaltsstoffen auch in Europa an Bedeutung. Lebensmittel gelten als „funktionell“, wenn Körperfunktionen durch den Verzehr bestimmter Nahrungsinhaltsstoffe positiv beeinflusst werden können und zu einer verbesserten Gesundheit beitragen. Präbiotische Kohlenhydrate (*sog. Präbiotika*) sowie lösliche und unlösliche Ballaststoffe wurden neben den weit verbreiteten probiotischen Milcherzeugnissen (*sog. Probiotika*) vermehrt Gegenstand ernährungswissenschaftlicher Forschung. Nach dem BgVV² sind **Probiotika** definiert als „lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“ (BgVV, 1999). Aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Magen- und Gallensäuren überleben sie die Magenpassage. Ihre gesundheitsfördernde Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt besteht

¹ IARC = International Agency for the Research on Cancer

² BgVV = Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin

darin, dass sie sich im Kolon ansiedeln und die Mikroflora positiv zu beeinflussen vermögen. Bei den **Präbiotika**, die natürlicherweise in Lebensmitteln enthalten sind oder diesen zugesetzt wurden, handelt es sich definitionsgemäß um „spezifische unverdauliche Stoffe, die selektiv Bifidobakterien und möglicherweise auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum im Darm fördern und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“ (BgVV 1999). Sie gelangen bis ins Kolon und dienen dort den Darmbakterien als Substrat.

Zu den „funktionellen Kohlenhydraten“ zählen pflanzliche Reservekohlenhydrate (z.B. *Inulin* und *Guar*), verschiedene Frukto-, Galakto- oder Xylo-Oligosaccharide (z.B. *Oligofruktose*) und *Resistente Stärke*. Ergänzt wird die Stoffgruppe durch Nicht-Stärke-Polysaccharide wie Pektine, β -Glukane, Hemizellulosen und Zellulose (Cummings und Englyst 1987a, Mortensen und Clausen 1996, Gibson et al. 1995).

Die positive Wirkung von Ballaststoffen auf den Gastrointestinaltrakt ist schon seit den 70er Jahren bekannt (Burkitt 1971, Mc Neil et al. 1978), sie wird heute jedoch kontrovers diskutiert. In einer Meta-Analyse verschiedener Fall-Kontroll-Studien aus dem Jahr 1992 konnten Howe et al. eine signifikante Reduktion des Risikos zur Ausbildung eines Kolorektalkarzinoms mit einer gesteigerten Ballaststoffzufuhr in Zusammenhang bringen. In neueren Studien, wie der amerikanischen „Nurses' Health Study“, konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen der Schutzwirkung von Ballaststoffen auf die Entstehung des Kolonkarzinoms gezeigt werden (Fuchs et al. 1999). Die protektive Rolle von komplexen Kohlenhydraten und Ballaststoffen aus der Nahrung im Hinblick auf die Karzinogenese wird auf verschiedene Faktoren zurückgeführt. Zum einen kommt es aufgrund der erhöhten Wasserbindekapazität zur Vergrößerung des Stuhlvolumens und durch eine stimulierte Darmperistaltik zur beschleunigten Darmentleerung. Des Weiteren sind eine fermentationsbedingte Absenkung des Stuhl-pH-Wertes sowie eine reduzierte Bildung toxischer sekundärer Gallensäuren zu beobachten (Nagengast et al. 1993). Den aus der mikrobiellen Fermentation komplexer Kohlenhydrate und Ballaststoffe entstehenden kurzkettigen Fettsäuren kommt eine besondere Bedeutung zu. Ihnen wird eine Reihe von Schutzwirkungen auf das Kolonepithel zugeschrieben (s. Abb. 2-1). Diskutiert werden zahlreiche Effekte auf Signaltransduktionsmechanismen und Teilprozesse der Kolonkarzinogenese (Scheppach et al. 2001; s. Abb. 2-6 und Kap. 2.5.3).

2.2 Kurzkettige Fettsäuren

2.2.1 Bildung und Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren

Im Folgenden wird der Begriff „kurzkettige Fettsäuren“ mit SCFA abgekürzt (*engl.* short chain fatty acids).

Als SCFA werden flüchtige, organische Monokarbonsäuren mit einer Kettelänge von C1 - C6 bezeichnet (Bugaut 1987; Übersicht, s. Tab. 2-1). Ihre Bildung erfolgt im Kolon monogastrischer Säuger u.a. durch mikrobielle Fermentation von im oberen Verdauungstrakt nicht hydrolysierbaren, komplexen Kohlenhydraten (Wolin 1981). Beim Menschen findet diese Fermentation überwiegend im Kolon statt, bei Wiederkäuern sind hingegen auch der Pansen (Rind, Schaf) sowie der Blinddarm (Kaninchen, Pferd) stark in die SCFA-Bildung involviert.

Tab. 2-1: Struktur und Nomenklatur von SCFA (modifiziert nach Bugaut 1987)

Strukturformel	Systematischer Name	Trivialname
H-COOH	Methan-	Ameisensäure
CH ₃ -COOH	Ethan-	Essigsäure
CH ₃ -CH ₂ -COOH	Propan-	Propionsäure
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	Butan-	<i>n</i> -Buttersäure
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Isobutan-	<i>iso</i> -Buttersäure
CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	Pentan-	<i>n</i> -Valeriansäure
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Isopentan-	<i>iso</i> -Valeriansäure
CH ₃ -(CH ₂) ₄ -COOH	Hexan-	Capronsäure

Die vollständige Fermentation dieser Substrate erfolgt durch die vorwiegend anaeroben Bakterien der Darmflora, deren Gesamtmenge in den Fäzes mit durchschnittlich 1×10^{11} /g Fäzesfeuchtmasse angegeben wird (Wolin 1981). Zu den häufig vorkommenden Fäzesbakterien zählen u.a. Vertreter der Gattungen *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium* und *Streptococcus* (Macfarlane et al. 1995).

Neben der Bildung der drei Hauptfettsäuren Essigsäure (C2, Azetat), Propionsäure (C3, Propionat) und Buttersäure (C4, Butyrat) führt die Fermentation hauptsächlich zur Bildung der Gase CO₂, H₂ und CH₄ (Wolin 1981, Mortensen und Clausen 1996). Die

Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikroflora und die damit eng verbundene Bildungsrate von SCFA und anderer Fermentationsprodukte hängen stark von der Ballaststoffzufuhr ab.

SCFA stellen neben Chlorid und Bikarbonat die Hauptanionen im Lumen des menschlichen Kolons dar. Ihre Gesamtkonzentration variiert innerhalb der einzelnen Kolonabschnitte zwischen 133 mmol/kg Darminhalt im aufsteigenden und ca. 78 mmol/kg Darminhalt im absteigenden Kolon (Cummings et al. 1987b). Das Konzentrationsverhältnis der drei Hauptfettsäuren im Kolon ist abhängig von dem zu fermentierenden Kohlenhydrat, liegt aber ungefähr im Verhältnis 3:1:1 vor: Azetat (60-75 %), Propionat (15-25 %) und Butyrat (10-15 %) (Hungate et al. 1959, Wolin 1981, Charney et al. 1998).

Einige wichtige Wirkungen der SCFA auf das Kolonepithel und auf Kolonkarzinomzellen sind in Abb. 2-1 zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden aus *in vitro* als auch *in vivo*-Studien gewonnen.

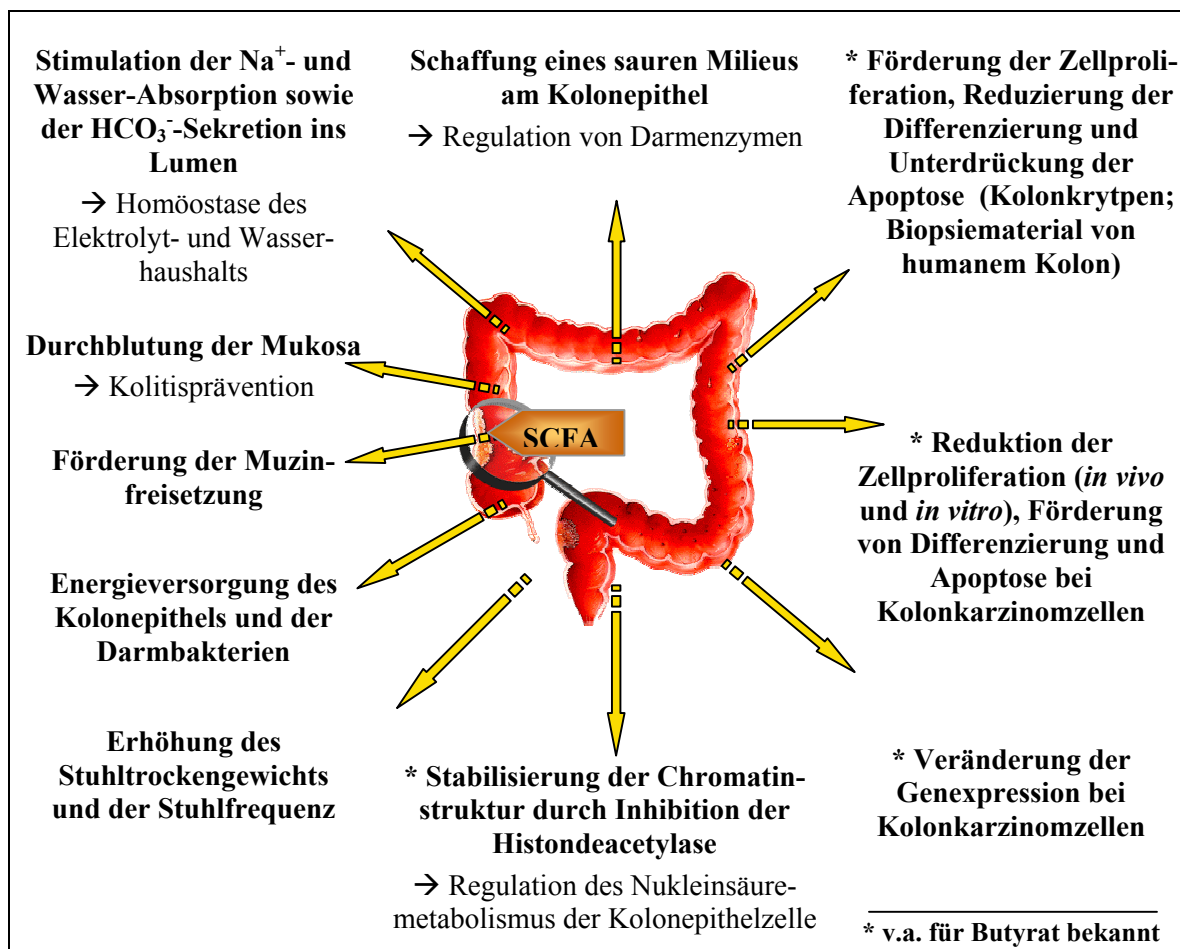


Abb. 2-1: Physiologische Wirkungen von SCFA, im Besonderen Butyrat, und deren Bedeutung für das Kolonepithel (nach Cummings und Englyst 1987a; Gamet et al. 1992; Boffa et al. 1992; McIntyre et al. 1993; Scheppach 1994; Scheppach et al. 1995; Lührs et al. 2002).

2.2.2 Resorption und Transport von SCFA und Elektrolyten im Kolon

SCFA werden schnell und fast vollständig aus dem Darm des Menschen absorbiert und metabolisiert, so dass sie zur Versorgung der Kolonozyten beitragen. Als Substrat wird hierbei Butyrat präferiert (Cummings und Englyst 1987a). Eine Vielzahl an Transport- und Regulationsstudien der letzten Jahrzehnte, z.B. am isolierten Kolonepithel des Meerschweinchens oder der Ratte (Rechkemmer und von Engelhardt 1988b; Rechkemmer et al. 1988a; Busche et al. 1997 und 2002; Mascolo et al. 1991) sowie *in vitro* an Kolonkarzinomzelllinien wie HT-29, HT-29 Klon 19A und Caco-2 (Busche et al. 1993, Stein et al. 2000), belegen die Zusammenhänge der je nach Darmabschnitt und Zellart variierenden Transportmechanismen von SCFA und anderen Elektrolyten in Epithelzellen. Methodisch kamen zur Untersuchung des Transports und seiner Mechanismen u.a. Fluxstudien in Ussing-Kammern, Messungen mit pH-sensitiven

Mikroelektroden sowie fluoreszenzmikroskopische Studien mit pH-abhängigen Farbstoffen wie BCECF oder SNARF-1 zum Einsatz.

Die pK_a -Werte der SCFA liegen unter 4,8, daher kommen sie nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung bei den physiologischen pH-Werten im Kolon (pH 6,0 – 7,5) bis zu 99 % in ihrer anionischen Form ($SCFA^-$) vor (Rechkemmer et al. 1988a, Mortensen und Clausen 1996). In Abb. 2-2 ist die SCFA-Absorption und der Elektrolyttransport im Kolon vereinfacht dargestellt.

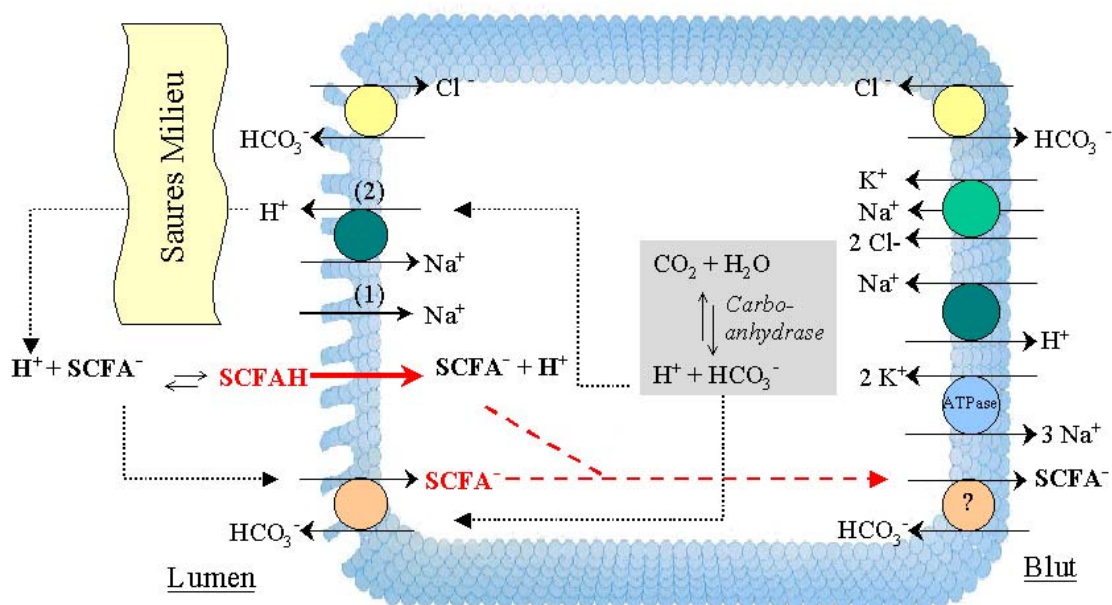


Abb. 2-2: Resorption von SCFA durch das Kolonepithel und deren Einfluss auf den Ionentransport im distalen und proximalen Kolon (modifiziert nach von Engelhardt 1994 und 1995; Busche et al. 1993 sowie Halm und Frizzell 1991). Erläuterungen s. Text.

(1) nur distales Kolon; (2) nur proximales Kolon

Die rasche Resorption der im Lumen vorliegenden $SCFA^-$ wird durch das saure Mikroklima nahe der Bürstensaummembran der Epithelzellen begünstigt. Es gilt als unabhängig vom luminalen pH-Wert (Rechkemmer et al. 1986). Dieses Mikroklima trägt zur Bildung der ungeladenen, protonierten SCFA ($SCFAH$) bei, welche die Zellmembran durch passive Diffusion schnell durchdringen können (s. Abb. 2-2). Zu einem weitaus geringeren Anteil werden die SCFA über den $SCFA^-/HCO_3^-$ -Antipporter in die Epithelzellen aufgenommen. Die zytoplasmatisch vorliegenden $SCFA^-$ werden entweder direkt metabolisiert oder über die basolaterale Membran ins Blut abgegeben und in den Geweben verstoffwechselt. Butyrat wird zu einem großen Teil direkt in der

Kolonepithelzelle verstoffwechselt und trägt dort zur Energiegewinnung bei. Propionat und Azetat gelangen vornehmlich zur Leber und werden dort metabolisiert (Cummings et al. 1987b).

Durch die Aktivität der zytoplasmatischen *Carboanhydrase* wird aus CO_2 , das beim SCFA-Metabolismus entsteht, HCO_3^- gebildet. Ein nach extrazellulär gerichteter Gradient für HCO_3^- vermittelt den elektroneutralen Antiport von Cl^- in die Zelle. Dieser $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter ist durch Stilbene (z.B. DIDS) hemmbar (Köttgen et al. 1994; s. Abb. 2-3). Eine erhöhte SCFA-Resorption ist somit wahrscheinlich für eine gesteigerte Cl^- -Aufnahme verantwortlich. Das ins Lumen abgegebene HCO_3^- kann erneut zum SCFA-Transport beitragen.

2.3 Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i)

2.3.1 Regulationsmechanismen des pH_i

Der pH_i gilt als wichtiger Parameter zur Aufrechterhaltung aller zellulärer Funktionen. Daher wird er von einer Reihe effizienter Puffersysteme und Regulationsmechanismen in der Zellmembran in engen Grenzen (bei den meisten Zellen zwischen 7,0 - 7,4) gehalten (Teleky et al. 1994, Busche et al. 1993). Transiente Änderungen des pH_i gelten als frühes Ereignis der zellulären Signaltransduktion, da sie eine Reihe von Zellfunktionen modulieren (s. Kap. 2.3.2).

SCFA wirken als schwache Elektrolyte, die zur Änderung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) beitragen. Beim pH_i von 7,2 - 7,4 kommt es zur Dissoziation der protonierten SCFA (SCFAH), was zu einer Anreicherung von H^+ im Zytoplasma und damit zu einer raschen Azidifizierung des pH_i führt (s. Abb. 2-3). Die aufgrund der SCFA-Deprotonierung steigende H^+ -Konzentration im Zytoplasma bedingt eine Aktivitätssteigerung des apikalen Na^+/H^+ -Austauschers (NHE). Durch den Transport von H^+ -Ionen ins Lumen ermöglicht er eine Steigerung der passiven Diffusion der SCFAH über die Aufrechterhaltung des sauren Milieus. Die gesteigerte Protonenextrusion ist dabei eng mit einer erhöhten Na^+ -Absorption verbunden (Bugaut 1987). Der als Haupttransporter für Protonen bekannte apikale NHE 1 ist durch Amilorid und dessen Derivate (z.B. EIPA) hemmbar (Rechkemmer und von Engelhardt 1988b; s. Abb. 2-3).

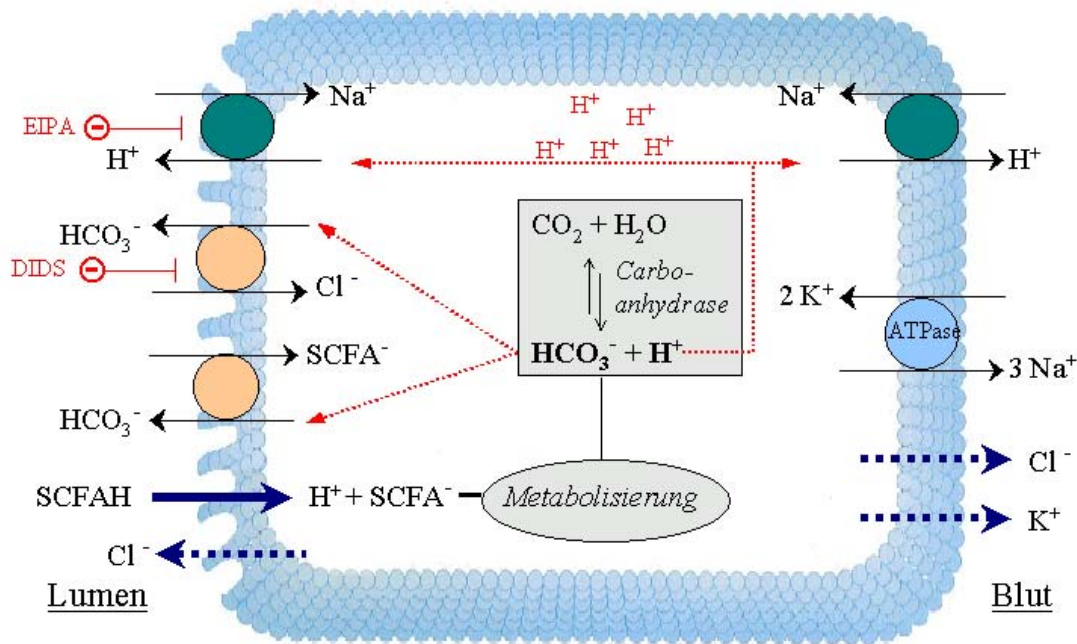


Abb. 2-3: Zelluläre Regulation des pH_i der Kolonepithelzelle unter Berücksichtigung von Elektrolyttransport-blockierenden Substanzen (nach Teleky et al. 1994; Köttgen et al. 1994; von Engelhardt et al. 1994 und von Engelhardt 1995). Erläuterungen s. Text.

Abk.: DIDS = 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid
EIPA = 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amilorid

Neben H^+ , Na^+ und K^+ spielen Cl^- und HCO_3^- bei der Vielzahl an Transportprozessen der pH_i -Regulation eine entscheidende Rolle. Es sei auf folgende Arbeiten verwiesen: McNeil et al. 1978; Ruppin et al. 1980; Argenzio und Whipp 1979; Roos und Boron 1981; Rechkemmer et al. 1988a; Rechkemmer und von Engelhardt 1988b; Mascolo et al. 1991; von Engelhardt et al. 1989 und 1994; Diener und Scharrer 1994; Teleky et al. 1994.

2.3.2 Bedeutung von pH_i -Änderungen für die Zelle

Die Regulation des pH_i ist für die Epithelzellen von größter Bedeutung, da sich alle biologischen Prozesse durch pH-Sensitivität auszeichnen. Genaue Zusammenhänge zwischen der Änderung des pH_i und der Modulation einer Reihe zellulärer Ereignisse sind bereits seit den 80er Jahren bekannt. Zu ihnen zählen die Modulation des transepithelialen Transports und der Durchlässigkeit von Ionenkanälen. Änderungen des pH_i beeinflussen Enzymaktivitäten von Enzymen, die ihr pH-Optimum im physiologischen Bereich haben, und führen damit zu Veränderungen der Protein-, DNA und RNA-Synthese. Darüber hinaus steht der pH_i mit der Zellproliferation sowie der

Kontrolle von Zellzyklus und Zellteilung in Verbindung (Busa und Nuccitelli 1984; Madhus 1988).

2.4 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$

2.4.1 Bedeutung der $[Ca^{2+}]_i$

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration, $[Ca^{2+}]_i$, spielt eine Schlüsselrolle in vielen Signaltransduktionswegen eukaryontischer Zellen. Sie liegt mit ~ 100 nmol/L um ein Vielfaches unter der extrazellulären Konzentration von 1,7 - 2,5 mmol/L. Der hohe Konzentrationsgradient für freie Ca^{2+} -Ionen wird von den Zellen durch eine Reihe von Regulationsmechanismen (Ca^{2+} -Pumpen, -Transporter, -Kanäle und Ca^{2+} -abhängige Proteine wie Calmodulin; s. Kap. 2.4.2) aufrecht erhalten. Freie Ca^{2+} -Ionen eignen sich nach einem Stimulus der Zellen als second messenger bei der Vermittlung extrazellulärer Informationen und Signale nach intrazellulär. Eine kurzfristige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (sog. Ca^{2+} -„waves“ und Ca^{2+} -„sparks“) hat wesentliche Bedeutungen für die Zellfunktion, während eine länger anhaltende hohe $[Ca^{2+}]_i$ als Signal zum programmierten Zelltod (Apoptose) gilt (Berridge et al. 1998).

Zytosolische Ca^{2+} -Signale sind an der Kontrolle der Zellproliferation, des Zellzyklus und der Differenzierung beteiligt (Leipziger et al. 1996; Berridge 1993). Denning et al. (1994) belegen in Studien mit der intestinalen Zelllinie HT-29 Klon 19A die Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen bei der Regulation des transepithelialen Elektrolyttransports. Die Bindung von freien Ca^{2+} -Ionen an Calmodulin ermöglicht die Aktivierung verschiedener Calmodulin-abhängiger Kinasen (CaM K) (Wilmanns et al. 2000). Ca^{2+} -Ionen vermitteln über eine Signalkaskade auch Informationen in den Zellkern, was Expressionsänderungen von sehr früh und kurzfristig regulierten Genen (sog. „early genes“) bewirken kann. An diesem Weg sind Transkriptionsfaktoren wie CREB (= cAMP response element binding protein) beteiligt, die durch CaM Kinase IV aktiviert werden können (Matthews et al. 1994; Krebs 1998; Chawla et al. 1998). Auch der Apoptose-Prozess ist durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ charakterisiert, wobei es zu Effekten auf nukleäre Zielproteine sowie zur DNA-Fragmentierung kommt (Santella und Carafoli 1997; Chawla et al. 1998).

Methodisch kommt zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ die Fluoreszenzmikroskopie mit Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen wie Fura-2, Fluo-3 oder Calcium Green zum Einsatz.

2.4.2 Regulation der $[Ca^{2+}]_i$

Abb. 2-4 zeigt die Ca^{2+} -Regulationsmechanismen in der Kolonepithelzelllinie HT-29. Grundsätzlich kann es hier auf zwei verschiedenen Signalwegen zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kommen: Durch Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum, ER und Mitochondrien) oder durch einen Einstrom von extrazellulär. Hierbei können Liganden-regulierte Ca^{2+} -Kanäle (LRC) zum Einstrom der Ionen führen. Ein auch als „kapazitiver Kalziumeinstrom“ bezeichneter Mechanismus zum Ca^{2+} -Einstrom wird durch spezifische sog. „Speicher-gesteuerte“- Ca^{2+} -Kanäle („store-operated“- Ca^{2+} -channels; SOCs), ermöglicht (Putney 1986; Berridge et al. 2000). Hierbei wird der Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär in Abhängigkeit vom Füllungszustand der intrazellulären Speicher reguliert.

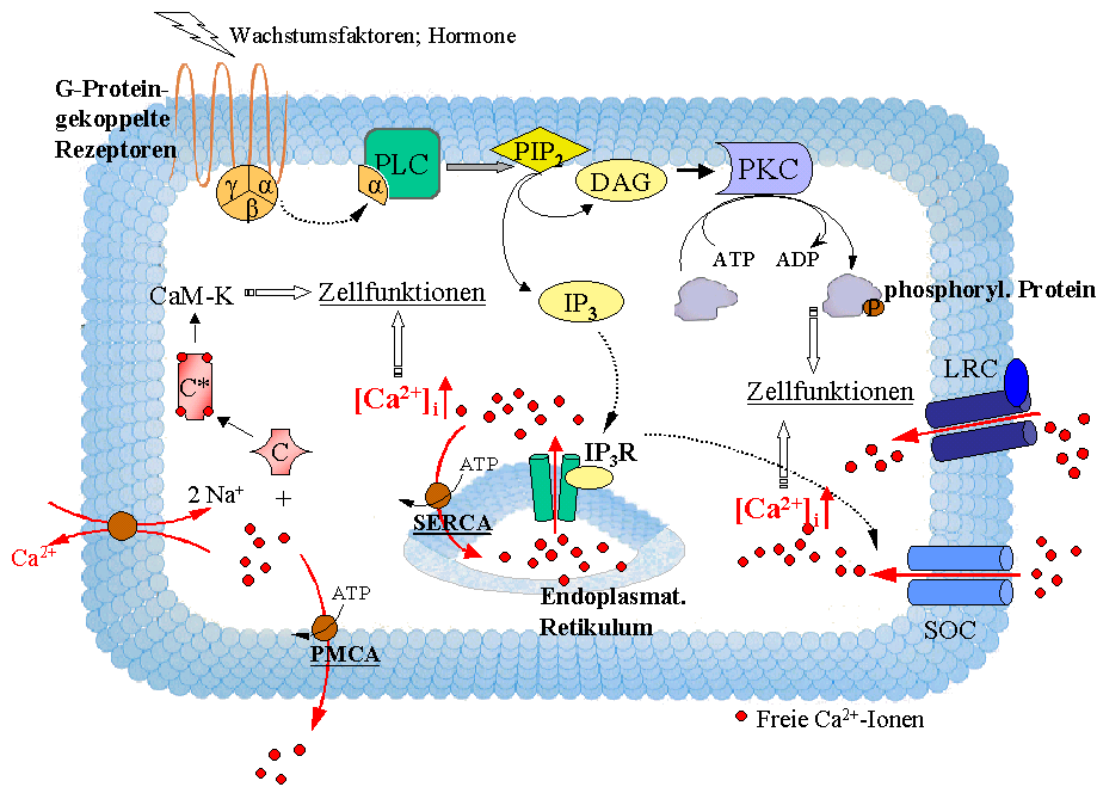


Abb. 2-4: Mechanismen zur Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ in der Kolonepithelzelle (nach Wolff et al. 1993, Berridge et al. 1998 und 2000, Leipziger et al. 1996, Bootman et al. 2001). Erläuterungen siehe Text.

Abk.: ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, C: Calmodulin, C*: Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex, CaM-K: Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase, DAG: Diacylglycerol, IP₃: Inositol-1,4,5-Triphosphat, IP₃R: IP₃-Rezeptor, LRC: Liganden-regulierter Ca^{2+} -Kanal, P: Phosphat-Gruppe, PIP₂: Phosphatidylinositol-Bisphosphat, PKC: Proteinkinase-C, PLC: Phospholipase C, PMCA: Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase, SERCA: Sarkoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase, SOC: „store-operated Ca^{2+} -Channel“.

Die Signaltransduktion erfolgt nach Bindung des Liganden über die G-Protein-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C- β (PLC- β). Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP_2) aus der Zellmembran zu den second messengern Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 vermittelt die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher über die Bindung an ligandenkontrollierte IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) am ER. DAG trägt zur Signaltransduktion bei, indem es über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die Phosphorylierung zytosolischer Proteine stimuliert (z.B. Kinase-Kaskaden). Durch Stimulation der G-Protein-gekoppelten, muskarinergen Rezeptoren der HT-29-Zellen z.B. mittels Carbachol, konnte die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER mit anschließender Öffnung der SOCs gezeigt werden (Fischer et al. 1992). Die Aufnahme der Ca^{2+} -Ionen in die intrazellulären Speicher durch SERCA kann mittels Thapsigargin inhibiert werden. Gleichzeitig führt die Substanz zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Speichern und ermöglicht die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Thastrup et al. 1990). Berridge et al. (2000) und Ma et al. (2000) charakterisieren das Modell der Kopplung des SOC-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms mit einer erniedrigten $[\text{Ca}^{2+}]$ im ER. Während der Entleerung der Ca^{2+} -Speicher am ER wird eine Verlagerung der IP_3 -Rezeptoren vom ER in die nähere Umgebung der SOCs der Plasmamembran angenommen, was die Aktivierung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms bewirkt.

Denning et al. (1994) zeigten an der intestinalen Epithelzelllinie HT-29 Klon 19A einen weiteren, IP_3 -unabhängigen Ca^{2+} -Influx-Weg, der über den second messenger cAMP durch cAMP-Agonisten wie Forskolin induziert wird.

Zur Normalisierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tragen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran (=PMCA) sowie am endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien (=SERCA). Sie befördern Ca^{2+} -Ionen durch aktiven Transport nach extrazellulär bzw. in die intrazellulären Speicher (Wolff et al. 1993). Auch Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calmodulin sind bei der Regulation der freien Ca^{2+} -Konzentration von Bedeutung.

2.5 Grundlagen der Karzinogenese

Bei der Entstehung eines Karzinoms handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess (Calvert und Frucht 2002; Kim und Mason 1996), der nachfolgend näher ausgeführt wird. Ausschlaggebend für die Ausbildung eines Karzinoms sind somatische oder erblich hervorgerufene genetische Veränderungen der Epithelzellen (Fearon 1997). Sie bilden die Grundlage für eine unkontrollierte Proliferation der Epithelzellen, was zur Vergrößerung des Gewebes und damit zur Ausprägung von Adenomen bzw. Karzinomen beiträgt.

2.5.1 Das Adenom-Karzinom-Modell

Anhand der Adenom-Karzinom-Hypothese werden die einzelnen Stufen der Karzinogenese (Initiation, Progression und Promotion) mit der Abfolge genetischer Mutationen oder dem Funktionsverlust bestimmter Genen assoziiert (Hill et al. 1978; Fearon und Vogelstein 1990b).

Das Modell (s. Abb. 2-6) geht von einer Entwicklung eines Kolonkarzinoms in einem Mehrstufenprozess aus. Ausgehend von zunächst normalem Epithel kommt es mutationsbedingt zunächst zu morphologischen Veränderungen. Die Akkumulation von Genmutationen führt zu verschiedenen Adenomstadien bis hin zum Karzinom. Kolonkarzinomzellen zeichnen sich durch eine unkontrollierte Proliferation und eine gehemmte Apoptose (= programmierter Zelltod) aus (Tarnawski und Szabo 2001). Der Entgleisung des Zellzyklus und der daraus resultierenden Hyperproliferation der Zellen liegen hauptsächlich Mutationen an Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen zugrunde (Fodde 2002). Ihr mutationsbedingter Funktionsausfall führt zur Störung des Gleichgewichts zwischen Zellteilung und Zelltod und damit zum autonomen Wachstum des Gewebes. Als weitere Gruppe können Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, durch Mutationen funktionsunfähig sein.

2.5.2 Bedeutung von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Karzinogenese

Wie oben schon erwähnt spielen hauptsächlich zwei Gruppen von Genen bei der Karzinogenese eine Rolle: Spezifische **Protoonkogene**, die in allen Zellen als inaktive Vorstufen der sog. Onkogene vorliegen und das Zellwachstum fördern sowie **Tumorsuppressorgene**, die in genetisch unveränderten Zellen das Zellwachstum

hemmen. Beide Gengruppen tragen zur Kontrolle des Zellzyklus und zur Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellteilung und Zelltod bei (s. Abb. 2-5). Mutationsbedingt kommt es während der Karzinogenese zu einer vermehrten Aktivierung der Protoonkogene und zu einer Inaktivierung der Suppressorgene, deren Funktionsausfall zusätzlich das Wachstum des Tumorgewebes fördert (Fodde 2002).

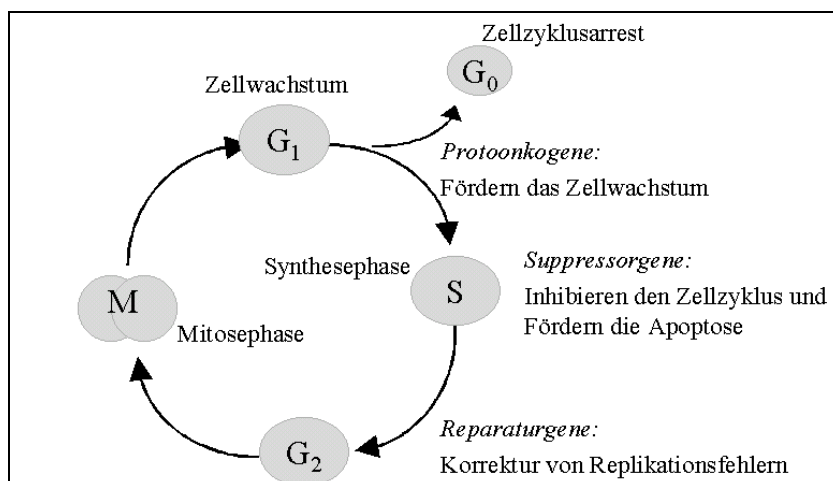


Abb. 2-5 Funktionen der Karzinom-assoziierten Gene im Zellzyklus einer normalen Zelle

Zu den Protoonkogenen zählen das *K-ras*-Gen und *c-myc*, zu den Tumorsuppressorgen das *APC*-Gen³, das *p53*-Gen und das *DCC*-Gen⁴.

Beim *APC* handelt es sich um ein „Schlüsselgen“ bei der Karzinom-Entwicklung. Seine Inaktivierung findet bereits in der Initiationsphase der Karzinogenese statt. Das Gen ist bei der erblichen Erkrankung FAP⁵ durch eine Keimbahnmutation in einem Allel geschädigt. Bei Patienten mit sporadischen Tumoren sind meist beide Allele mutiert. Das Genprodukt reguliert die Zellproliferation durch Bindung an β -Catenin, welches auch an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist. Weitere Funktionen kommen dem Catenin bei der Stabilisierung des Zytoskeletts sowie der Signaltransduktion zu. Der Ausfall des *APC*-Gens äußert sich in einer Hyperproliferation. Eine mögliche Beteiligung an der Apoptose wird diskutiert (Su et al. 1993; Fearnhead et al. 2001; Fodde 2002; Calvert und Frucht 2002).

³ *APC* = Adenomatous Polyposis Coli

⁴ *DCC* = Deleted in colon carcinoma

⁵ FAP = familiäre adenomatöse Polyposis

Das **DCC-Gen**, lokalisiert auf Chromosom 18q, ist in 70 % aller Kolorektalkarzinome mutiert (Fearon et al. 1990a). Dem Gen wird Bedeutung bei der Zell-Zell-Adhäsion und der Differenzierung beigemessen. DCC ist über die Aktivierung der Caspase-3 (Cysteinhaltige Proteasen, die ihre Zielproteine nach einem Aspartatrest spalten) an der Apoptose beteiligt und führt in Tumorzellen zu einem Zellzyklusarrest beim Übergang zwischen der G₂ in die M-Phase (Chen et al. 1999). Ein Fehlen des Gens äußert sich in unkontrollierter Proliferation und in Veränderungen bei der Zelladhäsion (Wraba 1997; Fearon und Vogelstein 1990b).

Das Genprodukt des Tumorsuppressors **p53** ist bedeutend als Kontrollpunktprotein beim Übergang des Zellzyklus in die G₁-Phase. Es ist an der DNA-Replikation und der Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen bzw. der Apoptose beteiligt. Darüber hinaus aktiviert es als Transkriptionsfaktor durch die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen eine Reihe anderer Gene (Hupp et al. 1992). DNA-Schäden führen zu einem Anstieg von p53 mit einem Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase, um eine Weitergabe des Schadens an die Tochterzellen zu verhindern. Kann die Schädigung durch DNA-Reparaturmechanismen nicht eliminiert werden, geht die Zelle in Apoptose über. Durch den Ausfall des p53-Gens beim Kolonkarzinom kommt es zum Verlust der Zellzykluskontrolle. In HT-29-Zellen ist das p53-Gen im Codon 273 (Arg → His) mutiert (Violette et al. 2002; Rodrigues et al. 1990; Wraba 1997; s. Abb. 2-5).

Die Protoonkogene **K-ras** bzw. **c-myc** sind in normalen Zellen an der Regulation der Zellproliferation (Rolle von *c-myc* als Wachstumsfaktor) oder der Signaltransduktion beteiligt. Eine K-ras-Mutation zählt zu den frühen genetischen Veränderungen beim Kolonkarzinom. Das Onkogen induziert über eine dauerhafte Stimulation Wachstumssignale, die zur unkontrollierten Proliferation beitragen.

Myc-Proteine verfügen über eine kurze Halbwertszeit, sie werden transient zur Zellproliferation, d.h. dem Bedarf der Zelle entsprechend, synthetisiert. Die dauerhafte Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in Karzinomzellen führt zu einer Hyperproliferation. *In vitro* kann Myc auch mit dem Tumorsuppressor p53 kooperieren und zum apoptotischen Prozess beitragen (Wraba 1997).

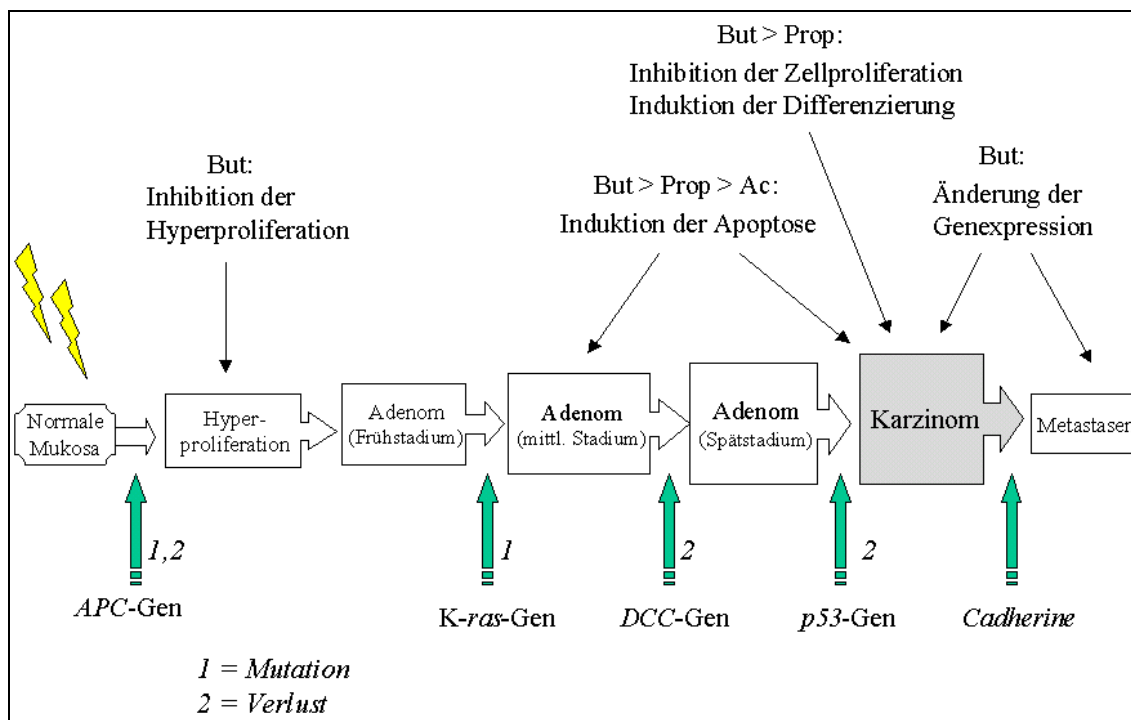


Abb. 2-6 Entwicklungsphasen und genetische Veränderungen während der Kolonkarzinogenese nach der Adenom-Karzinom-Hypothese unter Berücksichtigung der postulierten Effekte von SCFA (modifiziert nach Fearon und Vogelstein 1990b sowie Scheppach et al. 2001).

Abk.: But: Butyrat; Prop: Propionat; Ac: Azetat; APC: Adenomatous Polyposis Coli-Gen; DCC: Deleted in colon carcinoma-Gen.

2.5.3 Bedeutungen von SCFA beim Kolonkarzinom

Um die protektive Rolle der komplexen Kohlenhydrate bzw. der SCFA bei der Karzinogenese zu verstehen, ist es von Bedeutung, ihre Effekte in verschiedenen Phasen des Adenom-Karzinom-Modells (Initiation, Promotion und Progression; s. Abb. 2-6) zu studieren. Vor allem die Effekte von Butyrat in verschiedenen Phasen des Modells sind Gegenstand der Forschung. Im Zusammenhang mit der Karzinogenese sind Effekte der SCFA auf die Expression Zellzyklus-regulierender Gene und die Apoptoseinduktion von Bedeutung. In schnell proliferierenden Geweben wie dem Kolonepithel ist die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes von Zellproliferation und Apoptose von besonderer Wichtigkeit (Lührs et al. 2002). Die Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen ist in Karzinomzellen jedoch vermindert, was zu einer erhöhten Proliferation führt. Es wird daher postuliert, dass SCFA die Expression pro-apoptischer Gene wie *Bax* und *Bak* erhöhen, die Expression der anti-apoptisch geltenden Gegenspieler *Bcl-2* und *Bcl-X_L* hingegen vermindern können (Hague et al. 1995 und 1997; Menzel et al. 2002). Emenaker et al. (2001a und 2001b) zeigten SCFA-induzierte Veränderungen bei

der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren (*c-myc*, *PCNA*), Tumorsuppressoren (*p53*) und Apoptose-relevanter Gene (*Bax*, *Bcl-2*).

Ruemmele et al. (2003) gehen bei der SCFA-induzierten Apoptose in Caco-2-Zellen von einer Verknüpfung zwischen veränderten Expressionsmustern der Bcl-2-Familie mit Caspase-3 sowie mitochondrialem Cytochrom c aus. Dass SCFA in HT-29-Zellen Apoptose zu induzieren vermögen, konnten Heerdt et al. (1994) mittels des sog. DNA-„Ladderings“ dokumentieren.

SCFA sind in der Lage, die Proliferation von Karzinomzellen zu inhibieren, indem sie den Zellzyklus zwischen der G₁- und der G₀-Phase arretieren (s. Abb. 2-5). Zur Zellzykluskontrolle spielt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *c-myc* oder die DNA-Replikation beeinflussende Gene wie *PCNA* eine wichtige Rolle (Augenlicht et al. 2002, Wraba 1997).

Ein weiteres Charakteristikum von Kolonkarzinomzellen ist die vermehrte Expression von Cox-2⁶. Cox-2 ist für die Synthese von Prostaglandinen und Eikosanoiden verantwortlich. Es kommt in Kolonepithelzellen normalerweise nicht vor, sondern wird durch Wachstumsfaktoren, Onkogene, Tumorpromotoren oder Zytokine induziert, während die Isoform Cox-1 im Gewebe konstitutiv exprimiert bleibt (Hasegawa et al. 2001; Crew et al. 2000; Glinghammar und Rafter 2001). Ein erhöhter PGE₂-Spiegel⁷ aufgrund erhöhter Cox-2-Spiegel wird mit kolorektalen Neoplasien assoziiert und Cox-2 zugleich als treibende Kraft in der Tumorgenese gesehen, da die hohe PGE₂-Konzentration die Apoptose inhibiert (Tsujii und Du Bois 1995).

Der Transkriptionsfaktor **NF-κB**⁸ ist bedeutend bei der Regulation der Synthese von Entzündungsmediatoren während der Immunantwort. Es kann durch TNF-α⁹, Lipopolysaccharide oder Interleukin-1 aktiviert werden (Schutze et al. 1992, Cogswell et al. 2002). Seine Aktivität ist auch im entzündeten Kolongewebe sehr groß. Darüber hinaus ist NF-κB ebenfalls in der Lage, die Expression von Zielgenen, welche die Zellproliferation und Apoptose beeinflussen, zu regulieren. An Studien mit NF-κB-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich der Verlust von NF-κB im Kolonepithel in einer erhöhten Proliferationsrate äußert. Die vermehrte Expression des

⁶ Cox-2 = Cyclooxygenase-2

⁷ PGE₂ = Prostaglandin E₂

⁸ NF-κB = Nukleärer Faktor-kappa B

⁹ TNF-α = Tumor-Nekrose-Faktor- α

proliferationsfördernden TNF- α wird damit in Zusammenhang gebracht (Inan et al. 2000b). Butyrat ist nach Inan et al. (2000a) in der Lage, diesen TNF- α -induzierten Effekt zu inhibieren.

2.5.4 Bedeutung der MAP-Kinase-Kaskade beim Kolonkarzinom

MAP-Kinasen¹⁰ (MAPK) sind bedeutende Proteine der intrazellulären Signaltransduktion. Die Signalwege der MAPK stehen über spezifische Transkriptionsfaktoren in engem physiologischem Zusammenhang zur Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose und Kontrolle der Genexpression (Whitmarsh und Davis 2000). Zu den drei Gruppen von MAPK zählen die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen **ERK 1/ERK 2** (auch p42/p44), die häufig durch Mitogene (z.B. EGF¹¹) aktiviert werden, **p38** (38 kDa) sowie die c-Jun-NH₂-terminalen Kinasen **JNK 1** und **JNK 2** (46 bzw. 54 kDa). JNK- und p38-Kaskaden können durch eine Vielzahl an Stimuli, wie Zytokine, Entzündungsmediatoren und Stress, aktiviert werden, daher werden sie auch häufig als „Stress-aktivierte-Protein-Kinasen“ (SAPK) bezeichnet (Tanoue und Nishida 2003, Chang und Karin 2001). Sie sind für die Regulation von Apoptose und Zellproliferation zuständig, p38 darüber hinaus für Immunantworten (Johnson und Lapadat 2002). Alle MAPK werden durch eine Abfolge mehrerer Kinasen (= Kinase-Kaskade; MAPKK, MAPKKK) induziert, indem sie an Serin-/Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert werden (Chang und Karin 2001, Hommes et al. 2003). Die Aktivierung der MAPK kann zur Phosphorylierung einer Reihe zytoplasmatischer oder nukleärer Proteine, z.B. verschiedener Transkriptionsfaktoren führen, welche dann wiederum Zielgene des Zellzyklus zu induzieren vermögen.

In Tab. 2-2 sind die möglichen Signalkaskaden der MAPK aufgezeigt. Die Kaskade der ERKs beginnt zuerst über die Weiterleitung eines extrazellulären Signals z.B. durch das Mitogen EGF⁵⁰, über den entsprechenden Rezeptor nach Bindung des Liganden. Zur Übermittlung des Signals auf die Kinase-Kaskade dient im Fall der ERKs die Aktivierung des GTP-bindenden Proteins Ras und die Phosphorylierung von Raf-1. Die Vermittlung extrazellulärer Signale auf die JNK- bzw. p38-Kaskade ist weniger genau

¹⁰ MAP-Kinase = Mitogen aktivierte Proteinkinase

¹¹ EGF = epidermal growth factor

untersucht. Neuere Studien gehen von einem Raf-1-unabhängigen Weg aus (Pruitt et al. 2002).

Tab. 2-2: Aktivierungswege der MAPK-Kaskaden im Zytoplasma mit ihren möglichen Transkriptionsfaktoren im Zellkern. (modifiziert nach Chang und Karin 2001, Hommes et al. 2003, Johnson und Lapadat 2002 und Pruitt et al. 2002). *Abk.:* MKKK: MAP-Kinase Kinase Kinase; MKK: MAP-Kinase Kinase; MEKK: MAPK/ERK-Kinase-Kinase

MAPK-Kaskade	ERK 1 / 2	p38	JNK 1 / 2
Stimulus ↓ GTP-bindendes Protein ↓ MKKK ↓ MKK ↓ MAPK ↓ Transkriptionsfaktoren, z.B.	z.B. Wachstumsfaktoren (EGF) ↓ Ras ↓ Raf-1 ↓ MKK 1 / 2 ↓ ERK 1 / 2 ↓ c-myc, Elk-1, p90 RSK	z.B. Entzündungsreaktionen, Zytokine, UV ↓ ? ↓ TAK 1, ASK 1 ↓ MKK 3 / 6 ↓ p 38 ↓ NF-κB, c-jun, ATF-2	z.B. Entzündungsreaktionen, Zytokine, UV, Hitzeschock ↓ Ras ?, Rac ? ↓ MEKK 1 / 4 ↓ MKK 4 / 7 ↓ JNK 1 / 2 ↓ c-jun, ATF-2, Elk-1

2.6 Fragestellung

Die Lebensmittelindustrie tendiert in den letzten Jahren vermehrt zur Herstellung von Nahrungsmitteln, die präbiotisch wirksame Kohlenhydrate enthalten. Die Entwicklung immer neuer funktioneller Kohlenhydrate schreitet schnell voran. Im Rahmen eines BMBF¹²-geförderten Projektes synthetisiert die zentrale Forschungsabteilung der Firma Südzucker AG, Obrigheim neuartige, im oberen Verdauungstrakt nicht hydrolysierbare Kohlenhydrate. Durch eine *in vitro*-Fermentation der synthetisierten Oligosaccharide entstehen u.a. SCFA.

Ziel des Projektes war es, die Wirkung dieser gewonnenen Fermentationslösungen und analog dazu hergestellter Gemische aus reinen SCFA hinsichtlich ihrer karzinompräventiven Effekte am *in vitro*-Modell der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 zu testen. Da die Signalwege der Kolonkarzinogenese ein komplexes Netzwerk bilden, sind somit auch die möglichen Angriffspunkte für Ernährungsfaktoren sehr groß. Im Vordergrund steht die Frage, welche intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion während verschiedener Phasen der Kolonkarzinogenese durch SCFA bzw. Fermentationslösungen moduliert werden können (Abb. 2-7).

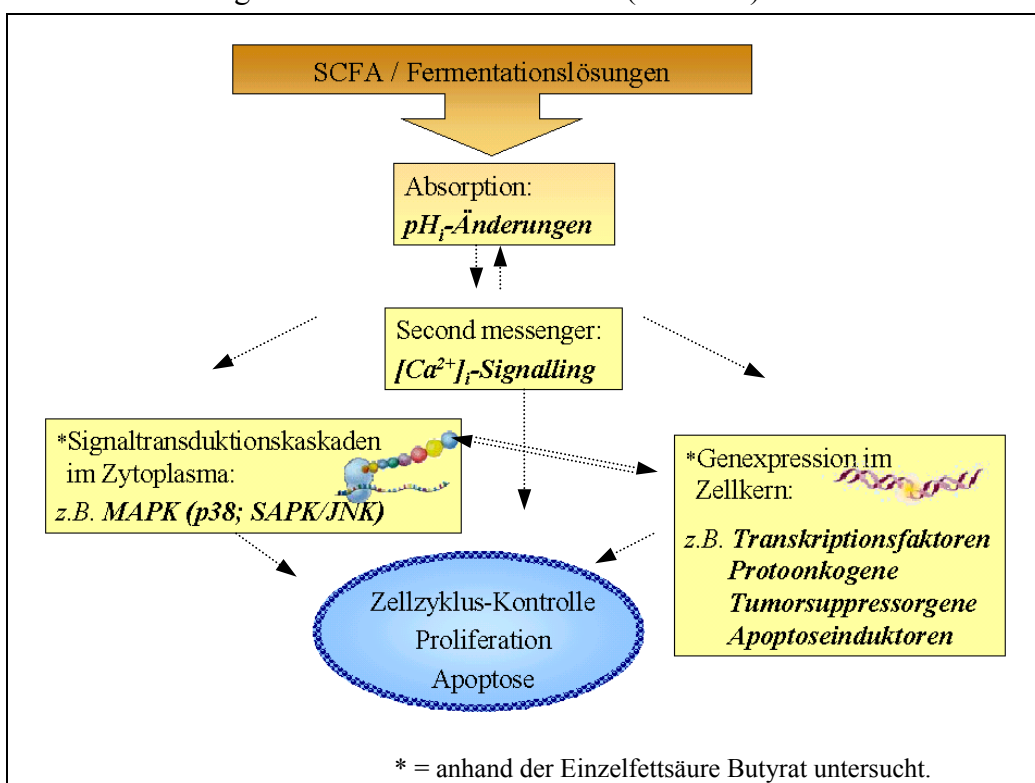


Abb. 2-7 Mögliche Interaktion von Mechanismen der Signaltransduktion beim Kolonkarzinom.

¹² BMBF = Bundesministerium für Bildung und Forschung

Folgende Fragestellung sollte untersucht werden:

- ❖ Welchen Einfluss haben die SCFA und Fermentationslösungen auf den intrazellulären pH-Wert (pH_i)?
- ❖ Welcher Zusammenhang besteht zwischen möglichen pH-Wert-Änderungen und der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$?
- ❖ Über welche Transport- und Regulationsmechanismen sind diese Effekte vermittelt? Gibt es möglicherweise Parallelen oder Unterschiede zwischen den gelösten Reinsubstanzen und den *in vitro* gewonnenen Lösungen, und worauf könnten diese zurückzuführen sein?

Zur Ermittlung dieser physiologischen Parameter wurde die computergestützte Fluoreszenzmikroskopie mit pH- bzw. Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen eingesetzt. Es stand zunächst zur Aufgabe, eine simultane Messmethode zur Bestimmung beider Parameter zu etablieren.

Molekularbiologische Untersuchungen sollten zur näheren Charakterisierung möglicher Signalwege für die Zellzyklusregulation, Proliferation und Apoptose beitragen, die beim Kolonkarzinom durch SCFA induziert oder inhibiert werden könnten. Die Signalwege der MAP-Kinasen sowie die Modulation der Expression krebsrelevanter Gene könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen. Folgende Fragestellungen waren in diesem Kontext interessant:

- ❖ Welche Effekte haben SCFA, im besonderen Butyrat, auf die Kinase-Kaskaden von p38 bzw. SAPK/JNK?
- ❖ Welche Onkogene, Tumorsuppressorgene oder Transkriptionsfaktoren können Butyrat-vermittelt in ihrer Expression aktiviert oder inhibiert werden und damit möglichen Einfluss auf die Progression bzw. Inhibition der Karzinogenese haben?

Die Einflüsse auf die Proteinaktivierung beider Kinase-Kaskaden wurden methodisch mittels SDS-PAGE und Western-Blotting untersucht. Transkriptionsänderungen von *Bax*, *Bcl-2*, *c-myc*, *Cox-1*, *Cox-2*, *NF- κ B* und *PCNA* wurden mit Hilfe von RT-PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

Die Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Puffer ist im Anhang A nachzulesen. Die dafür nötigen Chemikalien und Lösungsmittel stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) oder Serva (Heidelberg). Für molekularbiologische Versuche wurden Chemikalien mit dieser Zusatzeignung verwendet.

Die Bezugsquellen einzelner methoden- bzw. versuchsrelevanter Chemikalien, Gebrauchslösungen sowie Geräte sind bei den jeweiligen Abschnitten direkt im Text oder mit Fußnoten erklärt.

3.2 Testsubstanzen

3.2.1 Fermentationsüberstände

3.2.1.1 Gewinnung der Fermentationsüberstände

Die Gewinnung der Fermentationsüberstände (FÜ) erfolgte über eine *in vitro*-Fermentation mit humanen Fäzesbakterien in der Zentralabteilung Forschung, Entwicklung und Services (ZAFES) der Firma Südzucker AG, Obrigheim.

In Hungate-Röhrchen wurden 9 mL eines *in vitro*-Fermentationsmediums (anaerober Phosphatpuffer, pH 7,0; Zusammensetzung s. Anhang A.1) mit 0,5 % (w/v) des zu verstoffwechelnden synthetischen Oligosaccharids versetzt. Beim hier näher betrachteten FÜ handelt es sich um ein hydriertes Kondensationsprodukt aus Palatinose mit 4-10 Doppelbindungen. Die Röhrchen wurden mit 1 mL sogenanntem „fecal slurry“, einer 10 % igen Suspension aus humanen Mischfäzes zweier Probanden, beimpft. Die Fermentation der Kohlenhydrate zu SCFA fand innerhalb von 14 – 48 h unter Schütteln bei 37 °C statt.

Als Kontrolle des Fermentationsprozesses wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Zugabe von Oligosacchariden inkubiert. Dieser Fermentationsüberstand (FÜ) ist im Folgenden als FÜ „Kontrolle“ bezeichnet.

Die so gewonnenen Fermentationsgemische wurden bei 10.000 x g für 20 min. zentrifugiert und der zu analysierende Überstand mittels Sterilfiltern (0,25 µm) in autoklavierte Serumflaschen mit Butylgummistopfen filtriert. Lagerung und Transport der Überstände erfolgte bei –20 °C.

Nach dem Auftauen wurden die Proben für die Zellkulturversuche erneut sterilfiltriert (0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter¹³), da Trübungen in den Gefäßen sichtbar waren. Die Lösungen wurden aliquotiert und bis zum Gebrauch bei –20 °C gelagert.

3.2.1.2 Bestimmung der SCFA-Konzentration der FÜ mittels Gaschromatographie

Die Gehalte der während der Fermentation gebildeten Mengen an SCFA wurden über Headspace-Gaschromatographie (GC) in den Labors der ZAFES der Südzucker AG, Obrigheim ermittelt. Die nachzuweisenden flüchtigen, organischen Säuren (C₁-C₈) wurden zu entsprechenden Methylestern derivatisiert, Chloressigsäure diente als interner Standard. Die Kalibrierung erfolgte für jede Einzelfettsäure anhand der Detektion eines Standard-Gemisches verschiedener Konzentrationen. Genauere Spezifikationen zur GC-Untersuchung sind im Anhang B zu finden.

Die in dieser Arbeit verwendeten FÜ hatten folgende SCFA-Zusammensetzung (Tab. 3-1):

Tab. 3-1: SCFA-Zusammensetzung des FÜ bzw. des FÜ „Kontrolle“ gemessen mittels GC

	FÜ		FÜ "Kontrolle"	
	[mmol/L]	%	[mmol/L]	%
Azetat	31,8	56,6	9,3	66,4
Propionat	11,6	20,6	2,1	15,0
Butyrat	12,8	22,8	2,6	18,6
Gesamt-SCFA [mmol/L]	56,2		14,0	
pH bei der Lieferung	5,49		7,00	

3.2.2 SCFA-Gemische

Anhand der aus den GC-Analysen der Firma Südzucker AG ermittelten Konzentrationen von Butyrat, Propionat und Azetat, wurden analoge Fettsäuregemische

¹³ Fa. Schleicher und Schüll, Dassel

aus den Salzen der drei Einzelfettsäuren hergestellt und in den jeweiligen Versuchspuffern bzw. Medien gelöst (z.B. Ringer-Lösung oder PBS). Sie dienten als Vergleichsmöglichkeit neben dem FÜ „Kontrolle“, um zusätzlich zu verifizieren, ob FÜ-spezifische Effekte auf den pH_i bzw. die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt auf die reinen SCFA übertragbar sind, oder ob eventuell andere Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen für die beobachteten Effekte von Bedeutung sind.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Die Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29¹⁴ ist bereits sehr gut charakterisiert und wurde daher als *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Wirkungen der Testsubstanzen verwendet. Die Zelllinie wächst als polarisierter Monolayer und zeigt nach Modifikationen des Kulturmediums Differenzierungs-Charakteristiken, die denen normaler Kolonzellen ähneln (Blais et al. 1997). Sie eignen sich somit sehr gut für Experimente, die sich mit der Differenzierung und den Funktionen des Kolonepithels sowie den involvierten molekularen Mechanismen beschäftigen. Die Zellen konnten erstmals 1964 durch J. Fogh aus einem Primärtumor eines Kolonadenokarzinoms isoliert werden (Rousset 1986).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen¹⁵ in Kompletmedium (DMEM¹⁶ + 10 % FCS¹⁷ (v/v) + 1% Penicillin/Streptomycin¹⁸ (v/v)) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte im Inkubator. Jeden zweiten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, einmal pro Woche fand eine Passagierung der zu 90 – 95 % konfluenten Zellen statt. Die Kultur fand bis zu einer maximalen Passagezahl von 30 Verwendung und wurde dann verworfen.

¹⁴ Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig

¹⁵ Fa. Nunc, Roskilde (DK)

¹⁶ Dulbecco's Modified Eagle Medium, Fa. Gibco, Karlsruhe

¹⁷ Fetal Calf Serum, Fa. Gibco, Karlsruhe

¹⁸ Fa. Gibco, Karlsruhe

3.3.2 Aussaat für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente

Die trypsinierten Zellen wurden mit einer Zellzahl von $5,5 \times 10^4$ auf sterilen, runden Deckgläschen¹⁹ (\varnothing 40 mm), die mit sterilen Begrenzungsaufsätzen aus Silikon²⁰ (Flächeninhalt: 1 cm²) versehen waren, ausgesät. Die Kultivierung der Zellen für die Versuche erfolgte auch hier in oben genanntem Komplettmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Die ausgesäten Zellen wurden vom dritten bis fünften Kulturtag in subkonfluentem Zustand für die Versuche verwendet. Auf den Deckgläschen sind beim Mikroskopieren gleichmäßig verteilte, kleine Gruppierungen von Zellen (Zellinseln) in der Mitte des Deckgläschens sichtbar, während die Zellzahl an der Silikonbegrenzung bereits höher war. Jeweils 24 h vor dem Versuch wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

3.3.3 Aussaat für die SDS-PAGE bzw. das Western Blotting von MAP-Kinasen

Die trypsinierten Zellen wurden in 6-well Platten²¹ mit einer Zellzahl von 1×10^6 pro well in je 2 ml Komplettmedium ausgesät und wie oben kultiviert. Nach 24, 48, und 72 h erfolgte der Medienwechsel mit FCS-freiem Medium. Die Aktivität der nachzuweisenden MAP-Kinasen, welche durch die Wachstumsfaktoren des FCS beeinflusst wird, konnte somit minimiert werden. Die Behandlung der zu 90 % konfluenten Zellen mit der Testsubstanz Butyrat (3 mmol/L in FCS-freiem DMEM), bzw. Anisomyzin²² als Positivkontrolle, begann 2 h nach dem letzten Medienwechsel.

3.3.4 Aussaat für die RNA-Präparation zu Genexpressionsstudien

Die Aussaat erfolgte wie unter 3.3.3 in 6-well Platten²⁰ jedoch mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ pro well in je 2 ml Komplettmedium. Nach 3 Tagen Inkubationszeit (Bedingungen s. oben) wurde ein Medienwechsel mit FCS-freiem Medium durchgeführt, 24 h danach mit den einzelnen Butyrat-Behandlungen (Ansatz in FCS-freiem DMEM) begonnen. Der Zellrasen war bei Behandlungsbeginn zu 90 - 95 % konfluent.

¹⁹ Spezialanfertigung, Fa. VWR-International, Bruchsal (früher: Fa. Merck)

²⁰ *Flexi PERM Slides* Zellkulturkammern, Vivascience, Vertrieb über VWR International, Bruchsal

²¹ *Nunclon*TM, Fa. Nalge Nunc International, Roskilde (DK)

²² Fa. Calbiochem, Bad Soden (Taunus)

3.4 Ratiometrische Mikrospektrofluorimetrie zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ und des intrazellulären pH-Wertes (pH_i)

Die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ und des pH_i wurde mittels der Mikrospektrofluorimetrie (im folgenden als Fluoreszenzmikroskopie bezeichnet) in Anlehnung an Nitschke et al. (1996), Köttgen et al. (1994) und Zorec et al. (1993) durchgeführt. Dabei kamen die ratiometrisch messbaren Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2 bzw. BCECF²³ zum Einsatz. Zunächst wurden die Methoden zur Einzelmessung sowohl der $[Ca^{2+}]_i$ als auch des pH_i etabliert. Später wurden beide Parameter durch Kombination der Methoden in simultanen Messungen bestimmt. Die Kopplung beider Messmethoden wurde bisher seltener angewandt. Sie bietet jedoch den Vorteil, direkte Beziehungen zwischen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und des pH_i herstellen zu können.

Für die Fluoreszenzmikroskopie mussten die Zellen zunächst mit dem spezifischen Farbstoff für die Messung von H^+ -Ionen bzw. Ca^{2+} -Ionen inkubiert und einige Versuchsvorbereitungen getroffen werden. Diese sind in den nachfolgenden Punkten beschrieben.

3.4.1 Messprinzip mittels ionensensitiver Farbstoffe

Beim Messprinzip von ratiometrisch messbaren Farbstoffen macht man sich die unterschiedlichen Absorptionsmaxima des frei vorliegenden und des selektiv an Ionen gebundenen Farbstoffs zunutze. Die Farbstoffe haben durch die Bindung der jeweils zu bestimmenden Ionen (z.B. Ca^{2+} oder H^+) veränderte Absorptionsmaxima.

Die Methylester der Farbstoffe diffundieren durch die Zellmembran und werden dort durch zelluläre Esterasen hydrolysiert. Zum einen führt dies dazu, dass die Carboxylbindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen bzw. H^+ -Ionen frei vorliegen, zum anderen zur Fluoreszenz der Farbstoffe. Die Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zur Konzentration der Ionen im Zytoplasma, da die Komplexe zwischen Farbstoff und gebundenen Ionen intakte Zellen nicht wieder verlassen können.

Das Messprinzip sei anhand des Anregungsspektrums des Farbstoffs Fura-2, einem Chelatbildner zur Bestimmung der freien Ca^{2+} -Konzentration, erklärt: Regt man den

²³ beide Farbstoffe von Molecular Probes, Leiden, NL.

BCECF = 2',7'-Bis(2-carboxyethyl)5(6)-carboxyfluoreszein

Farbstoff Fura-2 in Verbindung mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen bei verschiedenen Wellenlängen an, erhält man das in Abb. 3-1 dargestellte Anregungsspektrum (Emission 510 nm). Daraus ist ersichtlich, dass der Farbstoff zwei Absorptionsmaxima besitzt: Es liegt während der Bindung an Ca^{2+} -Ionen bei 340 nm, während ohne die Bindung an Ca^{2+} -Ionen bei 380 nm ein Maximum zu sehen ist. Am sog. isosbestischen Punkt haben Änderungen der Ionenkonzentration keine Änderungen der Fluoreszenzintensität zur Folge; er liegt für Fura-2 bei 360 nm. Hier absorbieren Ca^{2+} -freies und Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 gleich stark. Wird nun der Farbstoff mit einer Wellenlänge unter dem isosbestischen Punkt angeregt, verstärkt sich die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration, während sie bei Exzitationswellenlängen oberhalb dieses Punktes bei zunehmenden Ca^{2+} -Konzentrationen abnimmt.

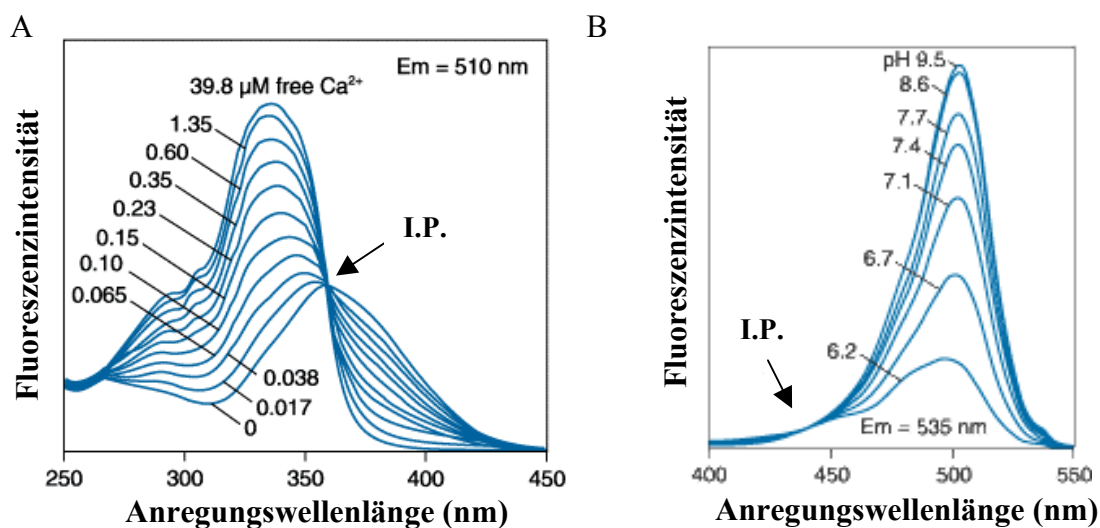


Abb. 3-1: Exzitationsspektren von (A) Fura-2 für verschiedene freie Ca^{2+} -Konzentrationen und (B) BCECF für verschiedene pH-Werte. I.P. = Isosbestischer Punkt

Die Bildung des Quotienten der beiden Fluoreszenzintensitäten ($F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$), die sog. „Ratio“, bietet den Vorteil, dass eine direkte Beziehung zur Ca^{2+} -Konzentration hergestellt werden kann. Die Ratioänderungen sind dabei proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Da beide Fluoreszenzintensitäten sowohl von der Fura-2-Konzentration in der zu messenden Zelle, als auch dem Zellvolumen und –durchmesser abhängen, erreicht man über die Bildung des Quotienten beider Fluoreszenzintensitäten die Unabhängigkeit von diesen Faktoren (Grynkiewicz et al. 1985; Deitmer und Schild 2000). Zur Verdeutlichung des Messprinzips s. Abb. 3-2.

Im Fall des zur Bestimmung des pH_i benutzten Farbstoffs BCECF macht man sich ebenfalls das Prinzip der Ratiobildung zu Nutze. Die pH-Abhängigkeit des Farbstoffs ist auf die Deprotonierung einer Phenolgruppe bei der Alkalisierung zurückzuführen, wodurch die Energie, die zur Anregung des Farbstoffmoleküls nötig ist, vermindert wird. Bei steigender Alkalisierung des pH-Wertes kommt es zu einer Verschiebung des Exzitationsspektrums zu höheren Wellenlängen und zu einer starken Erhöhung der Absorption von BCECF (s. Abb. 3-1). Das Anregungsmaximum liegt dann bei 495 nm. Eine Besonderheit bei der Messung des pH-Wertes mit BCECF ist, dass die zweite Exzitationswellenlänge von 440 nm gleichzeitig den isosbestischen Punkt markiert. Die Absorption von protoniertem und deprotoniertem Farbstoff ist hier identisch und damit unabhängig vom pH_i . Die Emission des Farbstoffs liegt zwischen 500 und 600 nm (Silver 1998, Deitmer und Schild 2000).

In den sog. „Pseudocolour“-Abbildungen werden hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - bzw. alkalische pH_i -Werte in gelb-orange-roten Farbtönen, niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - bzw. azide pH_i -Werte in grün-blau-violetten Farbtönen dargestellt (Abb. 3-2).

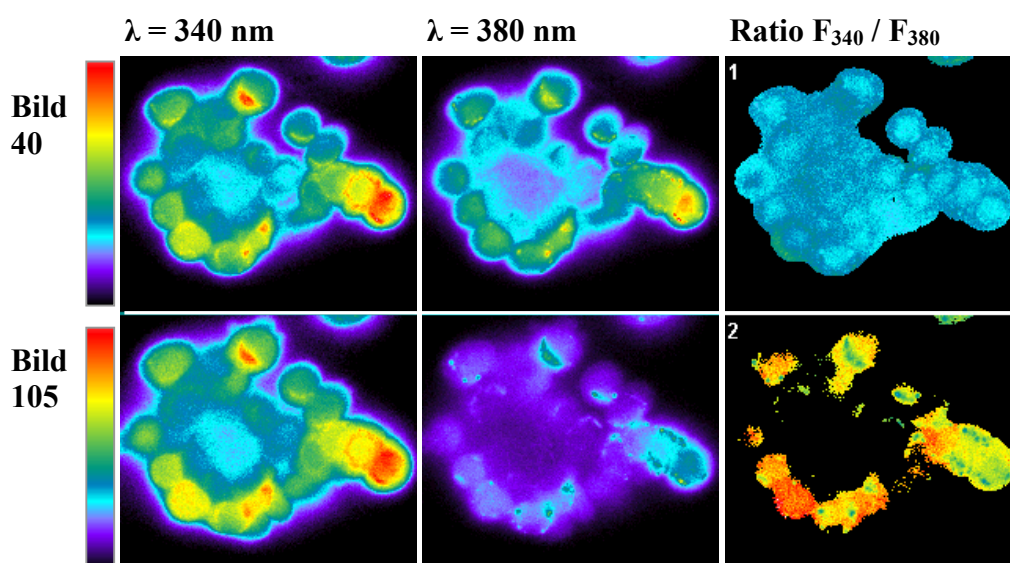


Abb. 3-2: Darstellung des Ratio-Imaging-Prinzips anhand von „Pseudocolour“-Bildern einer Fura-2-Messung von HT-29-Zellen. Anhand zweier ausgesuchter Bilder vor (Bild 40) und während eines Ca^{2+} -freisetzenden Stimulus (Bild 105) sind die Veränderungen der Einzelintensitäten und folglich der Ratios erkennbar (Vergrößerung: 400-fach).

3.4.2 Inkubation der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2 bzw. BCECF

Nach mindestens 3 Tagen Kultivierung auf den Deckgläschen (Aussaat siehe 3.3.2) wurde das Kulturmedium von den Zellen abpipettiert und die vorbereitete Markierungslösung zugegeben.

Für die **Einzelmessungen** der $[Ca^{2+}]_i$ bzw. des pH_i wurden die Ca^{2+} - bzw. pH-sensitiven Farbstoffe Fura-2 und BCECF in Form ihrer lipophilen Acetoxymethyl-Ester jeweils in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ (Verdünnung mit Ringer-Lösung; Zusammensetzung s. Anhang A.2) eingesetzt. Die Farbstoffe wurden dafür zunächst in DMSO aufgenommen und die Stammlösungen (1 mmol/L) bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur besseren Löslichkeit der Farbstoffe im Versuchspuffer und der besseren Aufnahme in die Zellen wurde 0,05 % (w/v, Endkonzentration) Pluronic[®] F127²⁴ hinzugefügt (Leipziger et al. 1991). Das Gesamtvolumen der Markierungslösung betrug 250 μL /Versuch. Die Inkubationszeiten für die Fura-2- bzw. BCECF-Lösung betrugen 60 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, respektive 15 min bei Raumtemperatur, unter Lichtausschluss.

Um das Volumen der aufgebrauchten Lösung konstant zu halten, wurden bei der **kombinierten Messung** von pH_i und $[Ca^{2+}]_i$ je 125 μL Fura-2- und BCECF-Lösung pipettiert. Es stellte sich heraus, dass bei der Kombination beider Parameter einige Änderungen beim Auftragen der Farbstoffe sowie bei den Einstellungen zur Fluoreszenzanregung vorgenommen werden mussten. Die Fura-2 Konzentration wurde hierfür auf 10 $\mu\text{mol/L}$ erhöht, die BCECF-Konzentration in der Markierungslösung auf 2,5 $\mu\text{mol/L}$ erniedrigt, um den Bereich der gegenseitigen Überlagerungen der Fluoreszenzintensitäten prozentual zu verringern. Ferner wurde die zweite Anregungswellenlänge für BCECF geringfügig geändert (s. Tab. 3-2 und Kap. 5.1.1).

Diese Anpassungen waren auch aufgrund der höheren Emission von BCECF (Zorec et al. 1993) und des Photobleachings nötig, das bei der kombinierten Meßmethode aufgrund der 4-maligen Exzitation der Farbstoffe stärker ausgeprägt war als bei den Einzelmessungen. Das Ausbleichen wird durch zu intensive Strahlung hervorgerufen, bei der die Farbstoffmoleküle zerstört werden können. Es äußert sich in einer verringerten Intensität der emittierten Strahlung, da weniger Moleküle zur Absorption zu Verfügung stehen. Der Versuchsablauf wurde so gewählt, dass bei einer geringst

²⁴ Molecular Probes, Leiden, NL

möglichen Anzahl an Belichtungen weiterhin verlässliche Ergebnisse ohne Bleaching-induzierten Artefakte erzielt werden konnten (s. auch Kap. 3.4.3 und 5.1.1).

3.4.3 Versuchsvorbereitung und Geräteaufbau

Die Silikonrahmen um die Farbstoff-markierten Zellen wurden unter Lichtausschluss entfernt und die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten in die dafür vorgesehene Perfusionskammer²⁵ eingesetzt. Der Aufbau dieser Messkammer ist in Abb. 3-3 gezeigt. Die Vorrichtung wurde mit einem Verschlussring verschraubt und die fertige Perfusionsvorrichtung auf dem Kreuztisch des Inversmikroskops²⁶ befestigt. Das Volumen der Messkammer ist durch entsprechende Aussparungen der Dichtungsringe wählbar; es betrug hier 230 mm³ (14 mm x 22 mm x 0,75 mm). Der Vorteil dieses Kammersystems ist, dass die Zellen kontrolliert und von außen unbeeinflusst während des Experiments konstant auf der Temperatur von 37 °C gehalten werden können. Sie werden unter gleichbleibenden Konditionen mit frischem Puffer superfundiert, was die Vitalität der Zellen erhält und Langzeitmessungen der zellulären Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ und pH_i ermöglicht. Die Kammertemperatur wie auch die Temperatur der Objektivheizung²⁷, werden dabei ständig über Temperatursensoren erfasst und über separate Regelkreise konstant gehalten.

²⁵ FCS 2 = *Focht Live-Cell Chamber System* mit Perfusionskammerheizung, Temperaturkontrollelement; Fa. Bioptechs, PA, USA

²⁶ *Axiovert S 100*, Fa. Zeiss, Jena

²⁷ mit elektronischem Kontrollelement; Fa. Bioptechs, PA, USA

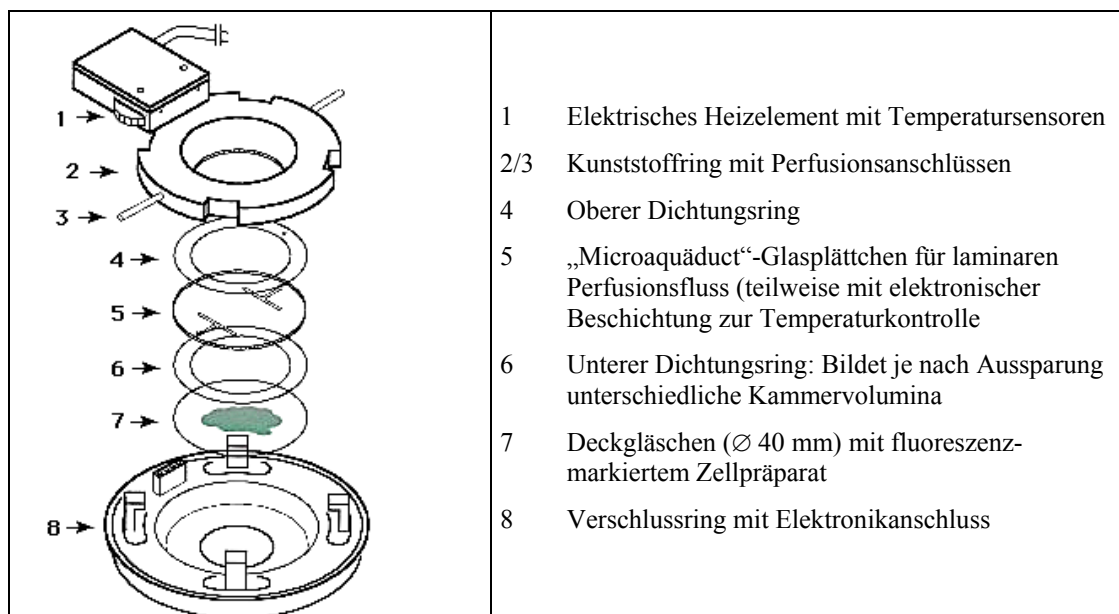


Abb. 3-3: Aufbau der Perfusionskammer FCS 2 zur Vorbereitung der Fluoreszenzmessungen von $[Ca^{2+}]_i$ und pH_i (Bioptechs Inc., Produktbeschreibung 2003)

Die Exzitation der Farbstoffe erfolgte mittels eines Monochromators mit Xenon-Lampe²⁸, der Licht der benötigten Anregungswellenlängen emittiert. Das Licht wird über einen Lichtleiter in das Inversmikroskop geleitet. Nach Passieren spezieller Strahlenteiler (Beamsplitter²⁹) und des 40x Öl-Immersionsobjektivs³⁰ trifft das Anregungslicht auf die jeweiligen Präparate. Die so angeregten Farbstoffe emittieren Licht einer anderen Wellenlänge (Tab. 3-2). Die Emissionsfilter²⁹ für Fura-2, BCECF bzw. für beide Farbstoffe lassen nur das Licht dieser Wellenlänge passieren und eliminieren letzte Anteile des noch vorhandenen Anregungslichtes. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird schließlich von einer CCD-Kamera³¹ erfasst.

Zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ bzw. des pH_i wurden nachstehende Anregungswellenlängen gewählt (Tab. 3-2). Zur Bestimmung des pH_i mit BCECF wurden sie den Gerätevoraussetzungen angepasst und weichen daher leicht von den optimalen Wellenlängen ab.

²⁸ Polychrome II, Fa. T.I.L.L. Photonics, Gräfelfing

²⁹ Filtersets ID: 71000 (Fura-2): Beamsplitter: 400 DCLP; 71001 (BCECF): Beamsplitter: 515 DCXR und 72000 (Kombination): Beamsplitter: 72100; Fa. Chroma Technology, Inc., Brattleboro, VT, USA

³⁰ Fluor[®] 40x Oil, Num. Appert. 1,3; Fa. Zeiss, Jena

³¹ RTE/CCD-Kamera ("charged coupled device"), Fa. Princeton Instruments, Inc.; Trenton, NJ, USA

Tab. 3-2: Exzitations- und Emissionswellenlängen zur ratiometrischen Messung von $[Ca^{2+}]_i$ bzw. pH_i . Zusätzlich sind die Belichtungszeiten der fluoreszenzmarkierten Zellen pro Bild angegeben.

	Fura-2		BCECF		Emission	Belichtungszeit
	λ_1	λ_2	λ_3	λ_4		
$[Ca^{2+}]_i$	340 nm	380 nm	-	-	510 nm	50 ms
pH_i	-	-	488 nm	438 nm	535 nm	50 ms
$[Ca^{2+}]_i + pH_i$	340 nm	380 nm	488 nm	436 nm	540 nm	30 ms

Die emittierte Fluoreszenz, die von der CCD-Kamera erfasst wird, kann nach Berechnung der jeweiligen Fluoreszenz-Ratios (s. Kap. 3.4.1) am Bildschirm als sogenanntes „Pseudocolour“-Bild sowie online als Graph dargestellt werden. Der Bildaufnahme und -verarbeitung diente dabei das Softwarepaket Meta Imaging Series für Windows^{®32}. Pro Versuch wurden die Messdaten von 7-8 Einzelzellen aus einem zusammenhängenden Zellverband im mittleren Bereich des Deckgläschens aufgezeichnet und ausgewertet. Über die Bildaufnahmesoftware MetaFluor³² konnten Messfelder über entsprechenden Einzelzellen auf dem Bildschirm markiert werden, für welche die Messwerte online übertragen werden sollten. Zur Korrektur der Messwerte wurde zusätzlich ein Hintergrundwert, eine definierte Messregion, in der keine Zellen lagen, automatisch abgezogen. Alle Messwerte der Einzelintensitäten sowie die Ratiowerte wurden online in das Auswertungsprogramm Microsoft[®] Excel 2000 übertragen und konnten dort ausgewertet werden.

3.4.4 Versuchsablauf und Messintervalle

Alle Versuchslösungen wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und standardisiert auf einen pH von 7,4 eingestellt, um Effekte der pH-Werte der verschiedenen Lösungen während der Messung auszuschließen. Von einer Schlauchpumpe³³ gefördert ($v = 1 \text{ mL/min.}$), gelangten die Lösungen aus einem Verteilerstück über Tygon-schläuche³⁴ zu den Perfusionsanschlüssen der Messkammer, in der sich die Zellen befanden und wurden nach dem Durchlaufen der Kammer einem Abfallgefäß zugeführt.

Vor jedem Versuch wurden die Zellen in der Perfusionskammer zunächst für 10 min. mit physiologischer Ringer-Lösung (Zusammensetzung s. Anhang A.2) gespült, um

³² Ver. 4.6.9 für Windows, Universal Imaging Corporation, PA, USA

³³ Gilson „Minipuls 3“, Fa. Abimed, Langenfeld

³⁴ ø innen 1/16"; Fa. Novodirect GmbH, Kehl

überschüssige Farbstoffreste aus der Messkammer zu entfernen. Die jeweiligen Experimente begannen jeweils mit einer 10-minütigen Aufzeichnung des Ruhezustands der Zellen, was nachfolgend als „Basalwert“ bezeichnet wird (Messintervall: 1 Bild pro 60 sec.), worauf die Perfusion der entsprechenden Testsubstanzen mit einem Messintervall von 1 Bild pro 2 sec bzw. pro 3 sec. bei der kombinierten Messmethode folgte. Je nach Experimentserie variierten die vor bzw. nach der Testlösung über die Zellen geleiteten Puffer, was eine Anpassung der Auswertungen erforderte. Alle Perfusionszeiten sind daher bei den jeweiligen Ergebnissen in Tabellen angegeben (ab Kap. 4.1.1). Bei Abschnitten, in denen bei Vorversuchen keine Effekte auf die Ca^{2+} - bzw. H^+ -Konzentration zu beobachten waren, wurden die Messintervalle von 2 bzw. 3 sec. auf 60 sec. erhöht, um das Photobleaching der Farbstoffe möglichst zu reduzieren.

Am Ende der Experimente erfolgte jeweils eine Kalibrierung des pH_i mit einem Messintervall von 1 Bild pro 15 sec; ausgenommen waren Experimente, in denen lediglich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen wurde.

3.4.5 Kalibrierungen

Zur Umrechnung der im Experiment erhaltenen Ratio-Werte in die entsprechenden pH_i -Werte bzw. die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wurden zwei unterschiedliche Kalibriertechniken verwendet.

3.4.5.1 *In vivo* Kalibrierung zur Bestimmung des pH_i

Die Kalibrierung des intrazellulären pH-Wertes erfolgte nach jedem Experiment *in vivo*, in Anlehnung an Thomas et al. (1979), über eine 3-Punkte-Kalibrierung mit Nigerizin³⁵ (10 $\mu\text{mol/L}$) und einem kaliumreichen Kalibrierpuffer (Zusammensetzung s. Anhang A.3) unterschiedlicher pH-Werte zwischen 6,8 und 7,6. Der Kationenaustauscher Nigerizin lagert sich in die Zellmembran ein und transportiert dort K^+ im Austausch gegen H^+ in die Zelle. Nach Angleichung der $[\text{K}^+]_i$ an die $[\text{K}^+]_{\text{ex}}$ wird H^+ so lange transportiert, bis auch hier eine Angleichung von $[\text{H}^+]_i$ und $[\text{H}^+]_{\text{ex}}$ erfolgt ist. Damit wird die Bedingung $\text{pH}_i = \text{pH}_{\text{ex}}$ erfüllt.

Die Kalibrierlösungen werden nacheinander über die Zellen geleitet und wirken dort jeweils einige Minuten ein, bis sich ein konstanter Ratiowert eingestellt hat. In einem Zyklus von 1 Bild pro 15 sec. werden 10 - 15 Ratiowerte pro Versuchszelle aufgezeich-

³⁵ Fa. Molecular Probes, Leiden, NL

net, gemittelt und die Signale gegen den pH_{ex} aufgetragen. Nach linearer Regression können die Ratiowerte in pH_i -Werte umgerechnet werden.

3.4.5.2 *In vitro* Kalibrierung zur Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Die Kalibrierungsformel zur Errechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Grynkiewicz et al. (1985) ist in Abb. 3-4 dargestellt. Die *in vitro*-Kalibrierung wurde in regelmäßigen Abständen, nach jedem Xenon-Lampenwechsel am Monochromator, mit Hilfe des wasserlöslichen Pentakaliumsalzes von Fura-2 und käuflich erwerblicher Kalziumkalibrierpuffer-Lösungen³⁵ (11 verschiedene Konzentrationen an freien Ca^{2+} -Ionen) durchgeführt. Die Lösungen wurden entsprechend den im Versuch verwendeten Fura-2-Konzentrationen mit dem wasserlöslichen Pentakaliumsalz versetzt, gut gemischt und für 30 min. im Dunkeln inkubiert. Nach dem Einspülen in die Perfusionskammer wurde für jede Konzentration mit einem Zyklus von 1 Bild pro 15 sec. je 10 Messpunkte aufgenommen (s. Abb. 3-5).

Die Ermittlung der einzelnen Formelbestandteile wird im Folgenden näher betrachtet.

$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \times S_f$	K_d = Dissoziationskonstante von Fura-2 (inverser log des x-Achsenabschnitts)
	R = gemessener Ratiowert der Testsubstanz
	R_{\min}/R_{\max} = Ratiowerte der niedrigsten (0 $\mu\text{mol/L}$) bzw. höchsten (39,8 $\mu\text{mol/L}$) Ca^{2+} -Konzentration im Kit
	S_f = Gerätekonstante = $\frac{\text{Intensität } F_{380 \text{ nm}} \text{ der } \text{Ca}^{2+}\text{-freien Lösung}}{\text{Intensität } F_{380 \text{ nm}} \text{ der } \text{Ca}^{2+}\text{-gesättigten Lösung}}$

Abb. 3-4: Formel zur Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Grynkiewicz et al. (1985)

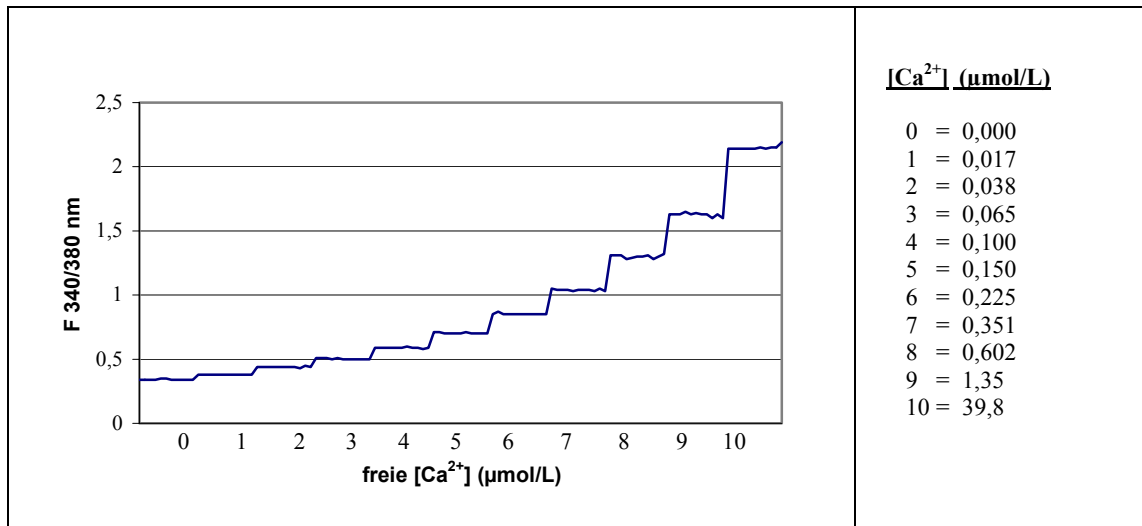


Abb. 3-5: Fluoreszenz-Ratiowerte zur Kalibrierung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Ca^{2+} -haltiger Kalibrierlösungen

Mit den Konzentrationen 0,000 bzw. 39,8 $\mu\text{mol/L}$ $[Ca^{2+}]_i$, nachstehend als „Ca-frei“ und „Ca-gesättigt“ bezeichnet, wurden jeweils Spektren aufgenommen, die zur Errechnung der Gerätekonstanten S_f bei 380 nm dienten (s. Abb.3-6).

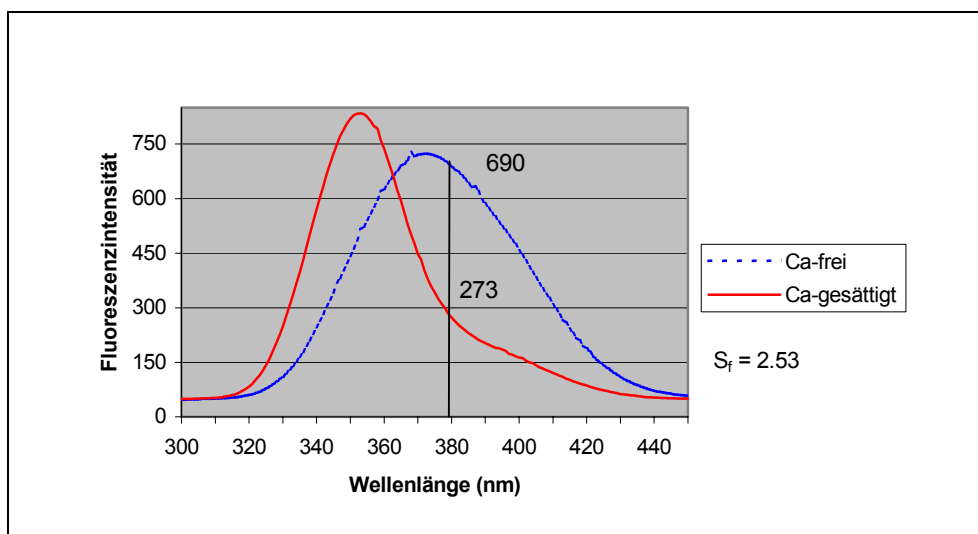


Abb. 3-6: Emissionsspektren von Ca^{2+} -freier und Ca^{2+} -gesättigter Kitlösung zur Ermittlung des S_f -Wertes. Dargestelltes Beispiel wurde gemessen mit Fura-2-Pentapotassiumsalz (10 $\mu\text{mol/L}$) bei 30 ms Belichtungszeit unter Verwendung des Filtersets für die kombinierte Messmethode.

Die doppeltlogarithmische Darstellung der Kalibrierwerte ermöglicht die Berechnung der Dissoziationskonstanten von Fura-2 (= K_d -Wert). Sie wird bestimmt über den x-Achsenabschnitt, bei dem der log der $[Ca^{2+}]_i$ einem Ratiowert von Null entspricht (Ermittlung über die Bildung des inversen Logarithmus; s. Abb. 3-7).

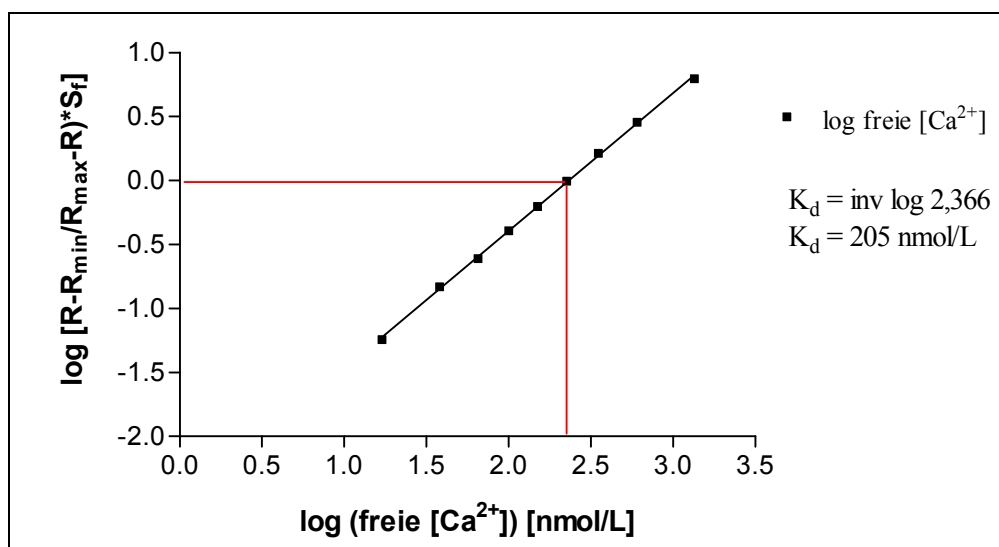


Abb. 3-7: Doppeltlogarithmische Darstellung der Kalibrierwerte mit linearer Regression (hier: $r^2=0,9994$) zur Bestimmung des K_d -Wertes.

3.4.6 Auswertung und Statistik

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (MW \pm SEM). Zur Datenauswertung wurde Microsoft Excel 2000 verwendet, für die statistischen Auswertungen (t -Test gepaart bzw. ungepaart) das Programm GraphPad Prism für Windows (Ver. 2.01).

Die Auswertungskriterien der einzelnen Versuchsabschnitte (später mit A, B, C, etc. angegeben) richteten sich nach dem jeweiligen Versuchsablauf, sie sind den einzelnen Tabellen im Ergebnisteil (ab. Tab. 4-1) zu entnehmen. Erläuterungen zur Auswertung der jeweiligen Versuchspunkte sind der Übersichtlichkeit wegen ebenfalls im Ergebnisteil zu finden.

3.5 Bestimmung biogener Amine mittels Reversed Phase-HPLC

Die Bestimmung der Konzentration biogener Amine in den FÜ wurde als weiterführende Untersuchung zur näheren Charakterisierung der FÜ durchgeführt. Biogene Amine (BA) entstehen durch Decarboxylierung ihrer Präkursoramino-säuren. Viele Mikroorganismen aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* besitzen Decarboxylasen und z.T. hohe Aminbildungspotentiale. Zu den am häufigsten vorkommenden BA zählen die hier untersuchten **Histamin**³⁶, **Cadaverin**³⁷, **Putrescin**³⁸, **Tyramin**³⁷, **Phenylethylamin**³⁷, **Spermidin**³⁷ und **Spermin**³⁷. Aufgrund des Fermentationsprozesses der neuartigen Kohlenhydrate mit dar-meigenen Mikroorganismen wird neben den SCFA und Fermentationsgasen ein entsprechender BA-Gehalt in den FÜ erwartet. Eine Reihe aliphatischer Amine, ebenso das heterozyklische Amin Histamin, sind in der Lage, die $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen und zu einer Ca^{2+} -Antwort zu führen (Benning et al. 1996; Wasserman et al. 1988; Pickles et al. 1991). Anhand der Methodik von Kirschbaum et al. (1994) wurden die Amine mittels Reversed Phase-HPLC bestimmt.

3.5.1 Probenaufarbeitung und Derivatisierungsreaktion

FMOC-Cl³⁹ bildet mit primären und sekundären Aminen sehr stabile und stark fluoreszierende 9-Fluorenylmethyl-carbamate (s. Abb. 3-8), die mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion (Exzitation 263 nm, Emission 313 nm) quantifiziert werden können. Die Methode ist nicht anwendbar zur Bestimmung von Tryptamin und Serotonin (Kirschbaum et al. 1994).

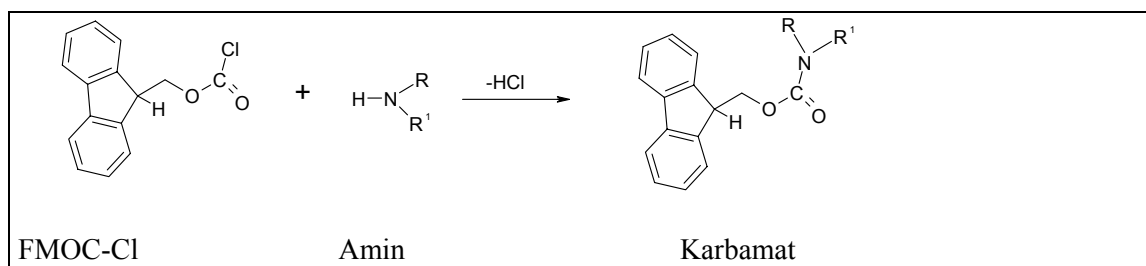


Abb. 3-8: Derivatisierungsreaktion von Aminen mittels FMOC-Cl zu fluoreszierenden Karbamat (nach Kirschbaum et al. 1994)

³⁶ Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München

³⁷ Fa. Fa. Serva, Heidelberg

³⁸ Fa. Fluka, Buchs, CH

³⁹ 9-Fluorenylmethyl-chloroformiat, HPLC-grade; Fa. Fluka, Buchs, CH

Da in Vorversuchen weder Schwebstoffe in den FÜ abzentrifugiert werden konnten, noch Eiweiß fällbar war, genügte eine einfache Verdünnung der Proben mit 0,1 mol/L HCl. Das Probenvolumen musste aufgrund des Autosamplers min. 400 µl betragen. Analysiert wurden die Verdünnungen 1:2 und 1:10.

Die Durchführung der Derivatisierung erfolgte analog zu Kirschbaum et al. (1994) mit Boratpuffer (0,5 mol/L Borsäure-Lösung, mit 30 % (w/v) KOH auf pH 8,5 eingestellt). Nach Zugabe von FMOC-Cl-Lösung (3 mmol/L gelöst in Azeton) wurde das Reaktionsgemisch 3 min. gemischt und als „Scavenger“ 50 µl Glyzinlösung (20 mmol/L) zur Entfernung von überschüssigem Derivatisierungsreagenz zugegeben. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde das Gemisch mit dem Starteluenten verdünnt und 20 µl dieser Endlösung zur Analyse injiziert.

3.5.2 Kalibrierung mittels Aminstandards

Die Stammlösungen der Einzelamine wurden entsprechend der Konzentration von 10 mmol/L in 0,1 mol/L HCl gelöst. Aus den Einzelstandards wurden Gemische aller Amine in den Endkonzentrationen 1, 10, 20, 50 und 100 µmol/L hergestellt und zur Kalibrierung verwendet. Über die Bestimmung des Achsenabschnitts und der Steigung der jeweiligen Regressionsgeraden konnten die integrierten Peakflächen in Aminkonzentrationen umgerechnet werden.

3.5.3 Chromatographische Bedingungen

Die Trennung der Gemische erfolgte bei 40 °C über eine „Supersphere RP Select B (C₁₈)“-Säule⁴⁰ mit einem binären Gradientensystem (Tab. 3-3).

HPLC-Anlage: D-7000 Interface, Fluoreszenzdetektor L-7300, Pumpe L-7100, Säulenofen L-7300, programmierbarer Autosampler L-7250 LaChrom-System.⁴¹

Säule: Supersphere RP Select B (C₁₈)⁴⁰, Temperatur: 40 °C

Detektion: Fluoreszenz (Ex. 263 nm, Em. 313 nm)

Eluenten: A: 100 mmol/L Natriumazetat, pH 4,4 mit NaOH; B: 100 % Azetonitril

⁴⁰ Fa. Merck, Darmstadt

⁴¹ Fa. Merck/Hitachi

Tab. 3-3: Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung der Aminderivate

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Flussrate (ml/min)
0,0	50	50	0,05
0,1	50	50	1,20
7,0	50	50	1,20
12,0	45	55	
27,0	35	65	
33,0	35	65	
40,0	5	95	
43,0	0	100	
52,0	0	100	
53,0	50	50	
60,0	50	50	1,20
61,0	50	50	0,05

3.5.4 Lösungen zur Messung der Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$

Um die Wirkung der Amine auf die $[Ca^{2+}]_i$ zu untersuchen, wurden die maximal detektierten Konzentrationen der Einzelamine in Messpuffer gelöst und die Zellen damit für 4 min. superfundiert. Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte anhand der Einzelmethode mit Fura-2, die Intervalle zwischen zwei Exzitationen betragen 2 sec.

3.6 Bestimmung der Endotoxinkonzentration mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Die quantitative Bestimmung der Endotoxingehalte zählt ebenfalls zu den weiterführenden Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Zusammensetzung der FÜ. Endotoxine sind hitzestabile Lipopolysaccharide (LPS), sie kommen als Hauptbestandteil in den Zellwänden Gram-negativer Bakterien vor. LPS zählen zu den Glykolipiden, sie wirken proinflammatorisch, indem sie in Monozyten und Makrophagen die Expression von Zytokinen (z.B. Interleukine 1 und 6, TNF- α) und Zelladhäsionsproteinen induzieren (Yang et al. 1998, Chow et al. 1999). Die intrazelluläre Signalweitergabe nach LPS-Aktivierung *in vivo* und *in vitro* erfolgt über CD14- sowie die Toll-like Rezeptoren TLR2 bzw. TLR4. TLR4-mRNA als auch das zugehörige Protein konnte in den intestinalen Epithelzellen HT-29, T84 und Caco-2 nachgewiesen werden (Yang et al. 1998; Cario et al. 2000). Für TLR2 konnte in HT-29-Zellen lediglich die mRNA, nicht aber das Protein nachgewiesen werden. Darüber

hinaus war LPS in HT-29- und T84-Zellen in der Lage, die Expression von NF- κ B zeit- und konzentrationsabhängig zu aktivieren (Cario et al. 2000; Savkovic et al. 1997).

3.6.1 Testprinzip

Beim Limulus-Amöbozyten Lysat- (LAL)-Test⁴² handelt es sich um einen chromogenen Test, der auf der Aktivierung eines Proenzym durch Endotoxine beruht. Die Enzyme sind in einem Lysat der Blutzellen (Amöbozyten) von *Limulus polyphemus* (Pfeilschwanzkrebs) enthalten. Durch den Kontakt mit Endotoxinen kommt es zur Agglutination der Blutzellen und zur Aktivierung der Enzyme. Diese katalysieren im Folgenden eine konzentrationsabhängige Farbreaktion, die auf der Spaltung des Farbstoffs *p*-Nitroanilin beruht.

Die Durchführung des Tests erfolgte anhand der mitgelieferten Beschreibung in Mikrotiterplatten⁴³. Alle nötigen Reagenzien waren enthalten (E.coli-Endotoxin, chromogenes Substrat, LAL und pyrogenfreies Wasser zum Lösen der Substrate), lediglich das Stop-Reagenz (25 % (v/v) Essigsäure oder SDS) musste hergestellt werden. Zu je 50 μ L verdünnter Probe bzw. Endotoxinstandard (1,0, 0,5, 0,25 und 0,1 Endotoxin-Einheiten (EU/mL) werden 50 μ L LAL pipettiert, gemischt und 10 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe und Mischen von je 100 μ L chromogener Substratlösung (37 °C) erfolgt eine weitere Inkubation für 6 min. 50 μ L Stoppreagenz beenden die Reaktionen.

3.6.2 Kalibrierung und Auswertung

Die Kalibrierung und nachfolgende Einordnung der Probe erfolgte anhand von Endotoxinstandards von E. coli (Stamm O111:B4, im Testpaket enthalten), die bei jedem Test mitgeführt wurden (max. Toxinkonzentration = 1,0 EU/mL). Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 - 410 nm am Mikrotiterplattenreader⁴⁴ unter Verwendung der Software *Softmax*^{®45}. Die Ergebnisse werden in Endotoxin-Einheiten (EU/mL) angegeben.

⁴² QCL-1000-Kit; Fa. Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, USA (früher: BioWhittaker)

⁴³ Cellstar[®] (96 wells mit Flachboden), Fa. Greiner, Solingen

⁴⁴ *ThermoMAX microplate reader*, Fa. Molecular Devices, Gräfelfing

⁴⁵ Version 2.34, Fa. Molecular Devices, Gräfelfing

3.6.3 Lösungen zur Messung der Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$

Um die Wirkung reinen Endotoxins auf die $[Ca^{2+}]_i$ zu untersuchen, wurde ein *E. coli* Endotoxin vom Stamm O55:B5⁴⁶ in Messpuffer gelöst und die Zellen mit den Lösungen für 4 min. superfundiert. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 100, 600, 1000 und 5000 EU/mL. Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte anhand der Einzelmethode mit Fura-2, die Intervalle zwischen zwei Exzitationen betragen 2 sec.

3.7 Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen)

3.7.1 Behandlung der Zellen und Probengewinnung

Der Einfluss von Butyrat (Endkonzentration 3 mmol/L) auf die Aktivierung der MAP-Kinasen **SAPK/JNK** bzw. **p38** wurde nach 1, 3, 5, 8, 24 und 48 h Inkubationszeit untersucht (Aussaat der Zellen s. 3.3.3).

Die Behandlungen mit Butyrat, angesetzt in Ca^{2+}/Mg^{2+} -haltigem PBS⁴⁷ und entsprechend verdünnt in FCS-freiem Medium, wurden so vorgenommen, dass alle Proben zur gleichen Zeit zur Lyse gebracht werden konnten. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit Anisomyzin⁴⁸ (10 µg/mL) für 1 Stunde, als Negativkontrolle FCS-freies Medium. Nach dem Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellproteine mit SDS-PAGE-Ladepuffer (s. Anhang A.4) denaturiert, 5 min. im Ultraschallbad behandelt und für 5 min. bei 95 °C im Thermomixer einem weiteren Denaturierungsschritt unterzogen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20 °C.

3.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße aus je 25 µl aufgetragener Einzelprobe kam die SDS-PAGE unter Zuhilfenahme von Tris-Glyzin-Fertiggelen⁴⁹ mit

⁴⁶ Fa. Cambrex Bio Science (früher: BioWhittaker)

⁴⁷ Phosphate Buffered Saline, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁴⁸ Fa. Calbiochem, Bad Soden (Taunus)

⁴⁹ Novex® Pre-Cast, Fa. Life Technologies, Karlsruhe

12 % Acrylamid zum Einsatz. Zusätzlich wurde pro Gel ein Proteinmarker⁵⁰ aufgetragen. Die Elektrophorese⁵¹ wurde im SDS-Laufpuffer (s. Anhang A.4) für 2 Gele gleichzeitig bei 180 V für 60 min. unter Kühlung durchgeführt.

3.7.3 Western Blotting

Die im Polyacrylamidgel getrennten Proteine wurden mittels sog. Western Blotting in einer Transferkammer⁵² bei 170 mA für 90 min. (2 Gele gleichzeitig) auf eine PVDF-Membran⁵³ übertragen und anschließend immungefärbt. Das Gel wurde zur Blotvorbereitung kurz in Transferpuffer (s. Anhang A.4) äquilibriert, die PVDF-Membran zunächst in Methanol angefeuchtet, in aqua dest. 5 min. gespült und für 10 min. im Transferpuffer äquilibriert. 2 Stücke Blottingpapier wurden in Anoden- bzw. 3 Stücke in Kathodenpuffer⁵⁴ getränkt. Bei der blasenfreien Schichtung der Blottingkomponenten wurden zunächst die mit Kathodenpuffer getränkten Papiere, gefolgt von Gel und PVDF-Membran übereinandergelegt. Den Abschluss bildeten die mit Anodenpuffer getränkten Papiere.

Nach dem Blotten wurde die Membran zur visuellen Kontrolle der Effizienz des Proteintransfers kurz in essigsaurer Ponceau S-Lösung (s. Anhang A.4) geschwenkt, anschließend in aqua dest. entfärbt und mit TBST-Puffer (s. Anhang A.4) gewaschen.

3.7.4 Immunfärbung und Stripping der Membran

Die Immunfärbung der Membranen erfolgte über Fluoreszein-markierte, sekundäre Antikörper, an die tertiär ein anti-Fluoreszein-alkaline-phosphatase-Konjugat (AFAP) gebunden wurde. Alle benötigten Reagenzien, das ECF-Substrat und die Fluoreszein-gebundenen Antikörper waren im verwendeten ECF-Western-Blotting-Paket⁵⁵ enthalten.

⁵⁰ Precision Plus Protein Standard (10-250 kD, blue), Fa. Bio-Rad, München

⁵¹ Penguin™ Water-Cooled Dual-Gel Electrophoresis System, Fa. PeqLab Biotechnologie, Erlangen

⁵² The Panther™ Semidry Electrobloetter, Fa. PeqLab Biotechnologie, Erlangen

⁵³ Hybond-P, Polyvinylidendifluorid, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg

⁵⁴ Fa. BioRad, München

⁵⁵ Fa. Amersham Biosciences, Freiburg

Die Membranen wurden zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen 90 min. in Blockierpuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST) geschwenkt. Anschließend wurden sie zunächst mit den phosphorylierten, primären Anti-MAPK-Antikörpern (AK) für SAPK/JNK⁵⁶ bzw. p38⁵⁷ (beide polyklonal rabbit-Ig, Verdünnung 1:500 in Blockierpuffer) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Vor und nach der nachfolgenden 1,5-stündigen Inkubation des sekundären anti-rabbit-Fluoreszein-gebundenen AK, wurde die Membran 3 x 5 min. mit TBST-Puffer (s. Anhang A.4) gewaschen. Es schloss sich die Inkubation des AFAP-Konjugats (5 µL Konjugat auf 13 mL TBST-Puffer) für 1 h an. Anschließend wurden die Membranen erneut 3 x in TBST-Puffer gespült, mit 500 µL ECF-Substrat (0,6 mg ECF Substrat pro mL ECF-Verdünnungspuffer aus dem Western-Blotting-Kit) überschichtet und in Frischhaltefolie 1 h im Dunkeln aufbewahrt. Vor der Detektion der Proteinbanden trockneten die Membranen für mindestens 30 min. unter Lichtausschluss.

Zur Bestimmung der Gesamtgehalte der SAPK/JNK- und p38-MAP-Kinasen wurden die Membranen 30 min. mit 40 % Methanol (v/v) geschwenkt und 2 x mit PBS gewaschen. Durch die Inkubation in Stripping-Puffer (s. Anhang A.4) für 30 min. bei 50 °C im Wasserbad, wurden die AK vollständig von der Membran gelöst. Es schlossen sich erneut zwei Waschschritte mit TBST-Puffer (je 15 min) sowie die Inkubation mit Blockierpuffer für 1 h bei Raumtemperatur an.

Alle Schritte der zweiten Immunfärbung mit den nicht-phosphorylierten, primären AK (1:500 Verdünnung) für die SAPK/JNK- bzw. p38-MAP-Kinasen wurden wie oben beschrieben durchgeführt und ihre Gesamtgehalte am Ende detektiert.

3.7.5 Nachweis der Protein-Banden und Auswertung

Die Proteinbanden wurden mittels Chemifluoreszenz⁵⁸ unter zu Hilfenahme der Auswertungssoftware *Quantity One*^{®59} nachgewiesen.

⁵⁶ Phospho-SAPK/JNK MAP-Kinase (Thr183/Tyr185)-Antikörper und SAPK/JNK MAP-Kinase-Antikörper, New England BioLabs GmbH, Frankfurt

⁵⁷ Phospho-p38 MAP-Kinase (Thr180/Tyr182)-Antikörper und p38 MAP-Kinase-Antikörper, New England BioLabs GmbH, Frankfurt

⁵⁸ *Fluor-STM MultiImager*, Fa. Bio-Rad, München

⁵⁹ The Discovery Series, *Quantity One*[®], Ver. 4.0.3, Analysis Software für Bio-Rad *MultiImager*

3.8 Expression ausgewählter Onkogene, Tumorsuppressorgene und Transkriptionsfaktoren

Aufgrund der bereits bekannten Effekte von Butyrat auf das Kolonepithel wurde der Einfluss dieser Einzelfettsäure auf die Expression folgender Gene untersucht: *Bax*, *Bcl-2*, *c-myc*, *Cox-1*, *Cox-2*, *NF-κB* und *PCNA*. Zu jedem Versuch wurde zusätzlich das konstitutiv exprimierte „Housekeeping“-Gen *GAPDH*⁶⁰ als Bezugsgröße mit amplifiziert.

3.8.1 Behandlung der Zellen

In unserer Arbeitsgruppe konnte in Proliferationstests bei einer Konzentration von 5 mmol/L Butyrat nach 2 Tagen keine deutliche Hemmung des Zellwachstums von HT-29-Zellen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden ($IC_{50} > 7$ mmol/L; Lang 2001, Roser 2002, persönliche Mitteilungen). Die Expressionsversuche konnten daher mit der Konzentration von 3 mmol/L Butyrat bei maximal 24 h Behandlungszeit durchgeführt werden.

Die Effekte von Butyrat in DMEM ohne FCS auf die 90 - 95 % konfluenten Zellen (Aussaat s. Kap. 3.3.4) wurden nach 1, 3, 6, 16 und 24 h Inkubationszeit untersucht. Als Negativkontrolle wurde jeweils DMEM ohne Zusatz verwendet. Als Positivkontrolle pro Versuchsreihe diente die Inkubation mit TNF- α (Endkonzentration 30 ng/mL), welches Cox-2 bzw. NF- κ B zu aktivieren vermag (Hardwick et al. 2001; Schutze et al. 1992; Nakao et al. 2002). Nach Beenden der Behandlungszeiten wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 1 x PBS (s. Anhang A.5) zweimal gespült.

Die Behandlungen wurden jeweils an Zellen durchgeführt, die aus derselben Passage stammten. Außerdem wurde bei der Versuchsplanung darauf geachtet, dass die Behandlungen möglichst zum gleichen Zeitpunkt abgestoppt werden konnten, um die interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen so gering wie möglich zu halten. Die nachfolgenden Schritte der RNA-Präparation, RT-PCR und Gelelektrophorese wurden für alle Proben parallel durchgeführt. Pro RT-PCR wurde GAPDH mit amplifiziert, so dass in der Auswertung die Amplifikate eines jeden untersuchten Gens zur Normalisierung auf die jeweils der Behandlungszeit entsprechende GAPDH-Probe bezogen werden konnte.

⁶⁰ GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

3.8.2 RNA-Präparation aus HT-29-Zellen

Die Lyse der behandelten Zellen zur Gewinnung der RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit GTC⁶¹-haltiger Denaturierungslösung (s. Anhang A.5). Die Zelllysate wurden sofort in Eppendorfgefäße gefüllt und auf Eis gestellt, wo die Ansätze zunächst 10 min. inkubierten. Nach phenolischer Extraktion⁶² (500 µL; 30 sec. gut mischen) folgte die Zugabe von 50 µL Na-Azetat (2 M in DEPC⁶³-Wasser, pH 4.0) und 100 µL eines Gemisches aus Chloroform/Isoamylalkohol⁶⁴ (49:1). Die Ansätze wurden 30 sec. auf dem Vortex-Gerät gemischt und bei 4 °C für 15 min. inkubiert. Die Trennung der Phasen erfolgte bei der 20-minütigen Zentrifugation (11.000 x g) bei 4 °C in der Kühlzentrifuge⁶⁵. Die obere Phase, welche die gelöste RNA enthielt, wurde abgenommen und über Nacht in 100 % Isopropanol bei -20 °C präzipitiert.

Das durch die Zentrifugation (11.000 x g, 20 min.) bei 4 °C gewonnene RNA-Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 350 µL Denaturierungslösung gelöst und gut gemischt. Nach Mischen mit 350 µL 100 % Isopropanol wurde die RNA erneut präzipitiert (1 Stunde bei -20 °C) und zentrifugiert (11.000 x g, 20 min., 4 °C). Die folgende Aufreinigung des gewonnenen RNA-Pellets erfolgte zweimal für 10 min. mit 70 % Ethanol (v/v in DEPC-Wasser) im Schüttler. Die Überstände wurden nach dem Abzentrifugieren (11.000 x g, je 5 min.) jeweils verworfen, die gereinigten RNA-Pellets anschließend in der Vakuumzentrifuge⁶⁶ getrocknet. Sie wurden in je 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 55 °C für 5 min. inkubiert. Das Lösen der RNA erfolgte innerhalb 1-2 h auf Eis. Die Lagerung der Proben bis zur RT-PCR erfolgte bei -80 °C.

3.8.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde in Anlehnung an Sambrook et al. (1989) nach photometrischer Bestimmung⁶⁷ der optischen Dichte (OD) in einer Probenverdünnung von 1:500 rechnerisch ermittelt (1 OD_{260 nm} entspricht 40 µg RNA/mL). Die zusätzliche

⁶¹ GTC = Guanidin-Thiocyanat, für Molekularbiologie, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München

⁶² Roti[®]-Phenol, Fa. Roth, Karlsruhe

⁶³ DEPC = Diethylpyrokarbonat; Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München

⁶⁴ beide Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München

⁶⁵ Heraeus Biofuge *fresco* Tischzentrifuge, Fa. Kendro, Hanau

⁶⁶ *Maxi dry plus*, Fa. Heto-Holten A/S; Allerød, DK

⁶⁷ UV/VIS Spektrometer, *Lambda Bio 20* + Software *UV WinLab* für Windows, Ver. 2.80.03; Fa. PerkinElmer Instruments, CT, USA

Berechnung des Quotienten aus maximaler Extinktion der Nukleinsäuren bei 260 nm zu maximaler Extinktion von eventuell vorhandenen Proteinen bei 280 nm ließ erste Schlüsse zur Reinheit der RNA-Proben zu. Der Quotient sollte bei einer guten RNA-Qualität zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

3.8.4 RNA-Gelelektrophorese

Die Qualität der RNA-Präparation kann anhand der Trennschärfe und Bandenintensität der ribosomalen RNA-Untereinheiten (28S- bzw. 18S-rRNA) beurteilt werden. Hierfür wurde eine RNA-Gelelektrophorese in einem denaturierenden, formaldehydhaltigen Agarosegel (1,2 %iges (w/v) 10 x MOPS-Agarosegel⁶⁸) durchgeführt. Für 50 mL 1,2 % Agarose-Gel wurden 0,6 g Agarose in 5 mL 10 x MOPS + 37,5 mL DEPC-Wasser aufgeköcht und vor dem Gießen des Gels 7,5 mL Formaldehyd⁶⁹ hinzugefügt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet (Herstellung s. Anhang A.5). Da RNA-Moleküle durch intramolekulare Basenpaarungen Sekundärstrukturen bilden können, wurden die RNA-Proben für die Elektrophorese mithilfe von Formaldehyd und Formamid⁶⁹ denaturiert. 1 µL RNA-Probe wurde mit 3,5 µL DEPC-Wasser + 2 µL 10 x MOPS + 3,5 µL Formaldehyd + 3,5 µL Formamid + 1 µL Ethidiumbromid (400 ng/µL) versetzt. Der Ansatz wurde bei 65 °C für 15 min. inkubiert, mit 2 µL „Blue Juice“ versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 60 Volt durchgeführt. Abb. 3-9 zeigt ein solches RNA-Kontrollgel.

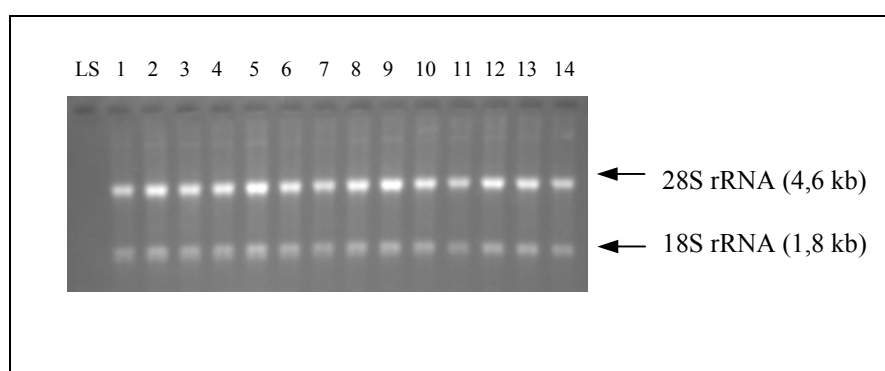


Abb. 3-9: Beispiel eines mit Ethidiumbromid gefärbten RNA-Kontrollgels (1,2 % (w/v) Agarose in 10 x MOPS). Aufgetragen sind je 23 µL Probe mit je 1 µL RNA. LS =Längenstandard

⁶⁸ MOPS = Morpholinopropan-Sulfonsäure; MOPS und Agarose: Fa. Serva, Heidelberg

⁶⁹ Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München

3.8.5 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* amplifizieren (Mullis et al. 1986). Das Reaktionsprinzip basiert auf der Vermehrung von DNA-Segmenten durch die DNA-Polymerase. Zwei Oligonukleotide (auch „Primer“ genannt) binden hierfür jeweils an den komplementären Sense- und Antisense-Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts auf dem denaturierten DNA-Doppelstrang. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Primer-Annealing“. In 5' → 3'-Richtung werden die Primer mit Hilfe der DNA-Polymerase verlängert („Extension“), was zur Verdopplung des von den Primern begrenzten DNA-Abschnitts führt. Durch Wiederholen der Teilschritte Denaturierung, Annealing und Extension kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnitts. Nach 30 – 35 Zyklen liegen meist genügend Amplifikate für die weitere Analyse vor. Isoliert man mRNA aus Zellen oder Gewebe, muss diese in einem vorausgeschalteten Schritt über eine reverse Transkription (RT) mit Hilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (sog. Reverse Transkriptasen) zunächst in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert werden.

Für die reverse Transkription der isolierten mRNA in cDNA und die anschließende Amplifikation mittels PCR lag ein käuflich erwerblicher RT-PCR-Test⁷⁰ vor. Dieser enthielt alle benötigten Pufferlösungen, reverse Transkriptase, Oligo-d(T)-Nukleotide (12-18 Nukleotide lang) und *Taq* DNA-Polymerase.

Entsprechend der Anleitung wurde das in jedem Reaktionsgefäß enthaltende Reaktionskügelchen mit 49 µL einer pd(T)₁₂₋₁₈-Gebrauchslösung (1 µL pd(T)₁₂₋₁₈-Stammlösung (0,5 µg/µL; Lagerung bei -20 °C) + 48 µL DEPC-Wasser) für 5 min. bei 4 °C gelöst. Zu jedem Ansatz wird 1 µL RNA-Probe (Vorverdünnung auf einen RNA-Gehalt von 4 µg/µL in DEPC-Wasser) pipettiert und die reverse Transkription im Thermozykler⁷¹ bei 42 °C für 30 min. gestartet (s. Tab. 3-4).

Nach Beenden der Reversen Transkription wurden die Gemische geteilt, so dass in der PCR aus jedem RT-Gemisch zwei cDNAs mithilfe ihrer spezifischer Primerpaare im Thermozykler amplifiziert werden konnten. Die fertigen RT-Gemische wurden dafür geteilt. Die Primer wurden vorverdünnt (je 100 ng/µL „sense“- bzw. „antisense“-Primer in DEPC-Wasser) und bei -20 °C gelagert. Aus ihnen wurde je nach Probenanzahl pro

⁷⁰ *Ready to Go*TM, RT-PCR Beads, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA

⁷¹ *DNA Engine*TM *Thermal Cycler PTC-200*; MJ Research Inc.; über Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch-Oldendorf

Gen eine Stammlösung hergestellt (je 1 μL „sense“- + „antisense“-Primer pro Reaktionsansatz) und vorsichtig gemischt. Nach versetzen der PCR-Reaktionsansätze mit je 2 μL Primer-Stammlösung wurde die PCR gestartet. Die verwendeten Primersequenzen und das Thermozyklerprogramm sind in Tab. 3-5 bzw. Tab. 3-4 aufgeführt.

Die Primersequenzen wurden anhand von Sequenzanalysen aus der 'Genbank'-Sequenzdatenbank ermittelt, und ihre Spezifität für die Gensequenz mithilfe des Internet-Suchprogramms „Blastn“ überprüft.

Tab. 3-4: Thermozyklerprogramm zur Durchführung der RT-PCR

	Temperatur und Zeit	Reaktionsschritt
1	4,0 °C	<i>Reverse Transkription</i>
2	42,0 °C für 30 min.	
3	4,0 °C	
4	95 °C für 5 min.	<i>Inaktivierung der Transkriptase</i>
5	95 °C für 30 sec.	<i>PCR</i> (30 Zyklen)
6	55 °C für 30 sec.	
7	72 °C für 60 sec.	
8	72 °C für 5 min.	<i>abschließende Elongation</i>
9	4 °C	<i>Ende</i>

Tab. 3-5: Nukleotidsequenzen der jeweiligen Primerpaare⁷² zur Amplifizierung der Gene in der PCR

Primer Gen	sense 5' → 3'	antisense 5' → 3'	GenBank Accession number
Cox-1	nt 1214-1238	nt 1707-1685	XM_011834.2
Cox-2	nt 932-955	nt 1655-1643	M90100.1
c-myc	nt 942-960	nt 1428-1445	BC000141
NF- κ B	nt 278-298	nt 874-855	HSNFKBSU
PCNA	nt 249-268	nt 497-472	NM_002592.1
Bax	nt 83-106	nt 572-549	HUMBAXA
Bcl-2	nt 487-515	nt 950-927	HUMBCL2C
GAPDH	nt 71-94	nt 570-547	BC004109

⁷² Alle Primer wurden bezogen von Fa. Roth GmbH, Karlsruhe

3.8.6 DNA-Gelelektrophorese

Die PCR-Reaktionsgemische wurden mit je 2 μL Farbmarkierungspuffer („Blue Juice“; s. Anhang A.5) versetzt und ein Aliquot von 22 μL für die DNA-Gelelektrophorese im 1,4 %igen (w/v) 1 x TBE-Agarose-Gel⁷³ aufgetragen. In die erste Geltasche wurde ein DNA-Längenstandard (24 - 726 bp)⁷⁴ pipettiert. Die Zusammensetzung und Herstellung des TBE-Puffers ist im Anhang A.5 dargestellt. Anschließend wurde das DNA-Gel 60 min. mit Ethidiumbromid (40 ng/ μL) gefärbt und in aqua dest. 60 min. entfärbt.

3.8.6.1 Nachweis und Auswertung der Banden

Der Nachweis der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden erfolgte nach UV-Anregung (520 nm Longpassfilter)⁷⁵ mit der Mess- und Auswertungssoftware *Quantity One*^{®76}. Anhand des DNA-Längenstandards konnten die Amplifikate zugeordnet werden. Zur Auswertung und Normalisierung der Banden wurde der Quotient aus optischer Dichte der Probe zu optischer Dichte GAPDH berechnet. Die RT-PCR lässt nur semi-quantitative Aussagen über die Veränderung der mRNA-Spiegel zu. Um genaue Aussagen zur Effektivität einer Behandlung auf die Expressionsrate zu erhalten wären Northern Blot-Hybridisierungen oder RNase Protection-Assays durchzuführen.

3.8.6.2 Statistische Auswertung

Zur Auswertung diente das Statistikprogramm Graph Pad Prism. Die p-Werte wurden mit einer One way-ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post hoc-Test bestimmt.

⁷³ TBE = Tris-Borat-EDTA-Puffer; Agarose: Fa. Serva, Heidelberg

⁷⁴ peqGOLD DNA-Sizer XIV, Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

⁷⁵ *Fluor-STM MultiImager*, Fa. Bio-Rad, München

⁷⁶ The Discovery Series, *Quantity One*[®], Ver. 4.0.3, Analysis Software für Bio-Rad *MultiImager*

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Fermentationslösungen und SCFA-Gemischen auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Wie bereits in den Kapiteln 2.3.2 und 2.4.1 erläutert, werden Änderungen des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in engen Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung, -proliferation oder Apoptose gebracht. Um die kurzfristigen Effekte der Fermentationsüberstände (FÜ) sowie der analogen SCFA-Gemische auf beide Parameter näher zu charakterisieren, wurden die HT-29-Zellen in einer kombinierten Messmethode mittels ratiometrischer Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Um die Transport- und Regulationsmechanismen zu charakterisieren, die den intrazellulären Veränderungen von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zugrunde liegen, wurden entsprechende Experimente gewählt: Zur Inhibierung des intestinalen Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) wurde das Amilorid-Derivat EIPA (Ethyl-Isopropyl-Amilorid) eingesetzt und die Effekte auf die pH -Homöostase untersucht (s. 4.1.2 bzw. 4.1.5). Um die Herkunft der zur Signaltransduktion benötigten erhöhten Konzentrationen freier Ca^{2+} -Ionen zu charakterisieren, wurden Ca^{2+} -freie, EGTA-haltige Superfusionslösungen verwendet (s. 4.1.3 bzw. 4.1.6).

Für die Superfusionsexperimente wurden die FÜ und SCFA-Gemische in einer 1:2-Verdünnung eingesetzt. Als Verdünnungsmedium diente der Versuchspuffer, bei Experimenten mit Inhibitoren bzw. Chelatoren waren diese ebenfalls im Verdünnungsmedium enthalten. Die begrenzte Menge der von der Firma Südzucker AG gelieferten FÜ trug dazu bei, dass die Versuchswiederholungen oftmals nur bei $n = 3$ lagen. Die jeweiligen Wiederholungen sind bei den Experimenten angegeben.

Aus Übersichtlichkeitsgründen sind die Auswertungsschemata unter Angabe der Superfusionslösung und -zeiten bei den jeweiligen Ergebnisunterpunkten zusätzlich tabellarisch dargestellt. Die Zahlenwerte zu jedem Versuch sind im Anhang C in entsprechenden Tabellen zu finden.

Im Folgenden sei die Wahl der Auswertungspunkte der jeweiligen Experimente, die sich auch in den zugehörigen Abbildungen wieder finden, kurz erläutert:

Zur Ermittlung des Basalwertes (**A**) für den pH_i bzw. die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden die Zellen zunächst mit Ringer-Lösung superfundiert und aus allen aufgenommenen Messwerten Mittelwerte gebildet. Die Anzahl der Messwerte richtet sich nach dem jeweiligen Versuchsablauf und ist aus den einzelnen Tabellen (ab Tab. 4-1) ersichtlich.

➤ **Auswertung zu Kap. 4.1.1 und 4.1.4:**

Experimente ohne Zusatz von Inhibitoren bzw. Chelatbildnern

Hier bezeichnet der Punkt **B** den Maximalwert während der Superfusion in Versuchen mit den FÜ. In Versuchen mit den SCFA-Gemischen gibt er den Minimalwert während der Superfusion an. Punkt **C** charakterisiert den Wert unmittelbar vor Ersetzen der FÜ- bzw. SCFA-Lösung mit Messpuffer. Punkt **D** gibt minimale pH_i - bzw. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte bei Experimenten mit dem FÜ an. Er kennzeichnet maximale pH_i - bzw. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte (sog. „Overshoots“) bei Experimenten mit den SCFA-Gemischen. Im Abschnitt **E** sind die letzten 10 Messpunkte mit Messpuffer zusammengefasst.

➤ **Auswertung zu Kap. 4.1.2, 4.1.3, 4.1.5 und 4.1.6:**

Experimente mit Zusatz von Inhibitoren bzw. Chelatbildnern

Die Auswertungspunkte **B-G** kennzeichnen in diesen Versuchen Punkte, direkt vor bzw. direkt nach einem Wechsel der Perfusionslösung liegen.

Der Punkt **B** bezeichnet jeweils die Messwerte unmittelbar vor der Behandlung mit den Testsubstanzen. Der Messpuffer wurde hier bereits mit Inhibitoren bzw. Chelatbildnern versetzt, um eventuell auftretende Effekte zu erkennen. Die Punkte **C** bzw. **D** sind jeweils während der Superfusion der Testlösungen, die zusätzlich Inhibitoren bzw. Chelatbildner enthielten, gewählt. **C** bezeichnet dabei den Maximal- bzw. Minimalwert, der je nach Testsubstanz gemessen wurde. Demgegenüber bezeichnet **D** die Messpunkte unmittelbar vor dem Austausch der FÜ- bzw. SCFA-Lösung durch den nachfolgenden Messpuffer, der zusätzlich die Inhibitoren bzw. Chelatbildner enthielt. Blieben die Messwerte während der Superfusion unverändert, wurden sie alleine im Punkt **C** vereint. Unter **E** sind die Maximal- bzw. Minimalwerte für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oder den pH_i angegeben, die aufgrund der Superfusion mit den Pufferlösungen + Inhibitoren bzw. + Chelatbildnern auftraten. Der Punkt **F** markiert die Messwerte, die am Ende des Perfusionsabschnitts mit vorausgegangen Pufferlösungen erreicht waren. Er gibt an, wie weit die Regulation hin zu den Basalwerten bereits erfolgt ist. Im Abschnitt **G** sind die letzten 10 Versuchspunkte, die mit Messpuffer ohne jegliche Inhibitoren bzw. Chelatbildner aufgezeichnet wurden, jeweils als Mittelwert angegeben.

4.1.1 Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ während der Alkalisierung des pH_i durch Behandlung mit Fermentationsüberständen

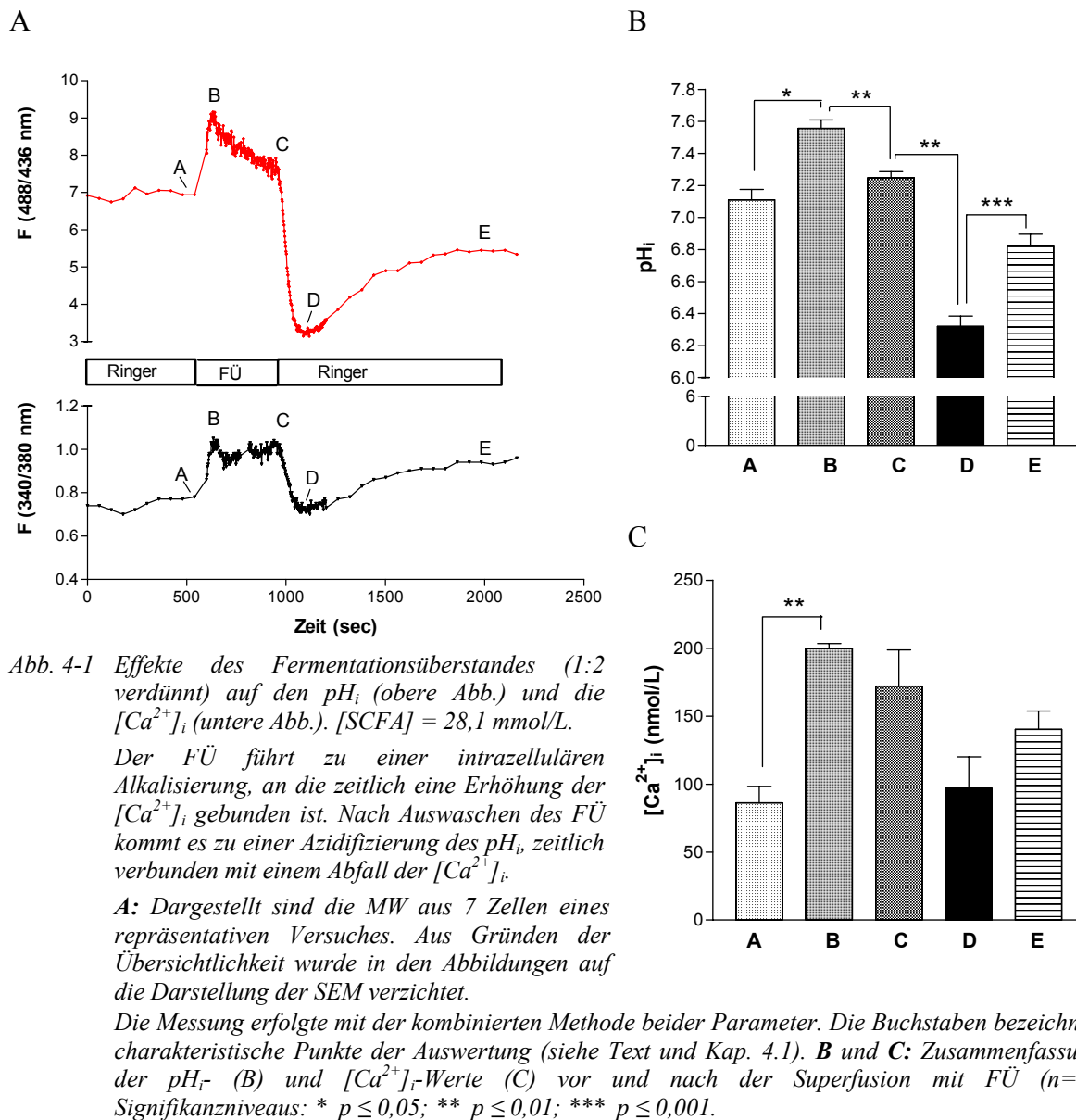
Zunächst wurden die Effekte des Fermentationsüberstandes (FÜ; 1:2 verdünnt) auf die Zusammenhänge von pH_i und $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Zur Auswertung der Versuchsreihe siehe Tab. 4-1.

Tab. 4-1: Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-1.
 Testsubstanz: Fermentationsüberstand (FÜ) 1:2 verdünnt in Messpuffer.

Auswertungspunkt	A	B	C	D	E
Superfusionslösung	Puffer	FÜ 1:2 in Puffer		Puffer	
Zeit (min.)	10	6		20	
Messintervall (sec.)	60	3/60		3/60	

Es können direkte zeitliche Zusammenhänge zwischen der FÜ-induzierten Alkalisierung des Zytoplasmas und einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ gezeigt werden. Die Superfusion mit dem FÜ führt zu einer schnellen, signifikanten Alkalisierung des pH_i von $7,11 \pm 0,06$ auf $7,56 \pm 0,05$ ($p \leq 0,05$; $\Delta = 0,45 \pm 0,06$ pH-Einheiten), damit verbunden ist eine signifikante Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ von 86 ± 12 auf 200 ± 4 nmol/L ($p \leq 0,01$; Abb. 4-1 A und C, Abschnitt A-B). Im Lauf der Superfusion sinken die pH_i -Werte langsam ab, die $[Ca^{2+}]_i$ bleibt jedoch erhöht.

Beim Auswaschen des FÜ kommt es zu einer signifikanten intrazellulären Azidifizierung von einem zytosolischen pH-Wert von $7,25 \pm 0,04$ auf $6,32 \pm 0,06$ (Abb. 4-1 A, Abschnitt C-D, $p \leq 0,01$), was zeitlich mit einem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf 97 ± 23 nmol/L verbunden ist. Es schließt sich eine Phase an, in welcher der pH_i ($p \leq 0,001$) als auch die $[Ca^{2+}]_i$ wieder in Richtung der Basalwerte zurückreguliert werden (Abschnitt D-E). Die $[Ca^{2+}]_i$ steigt dabei sogar etwas über die Ausgangswerte hinaus an. Die deutliche Azidifizierung des Zytoplasmas nach Ausspülen der Testsubstanz (Abb. 4-1 A, Abschnitt D) führt zu einer Verringerung der intrazellulär frei vorliegenden Ca^{2+} -Ionen.



In nachfolgender Abb. 4-2 sind die Ratioänderungen der $[Ca^{2+}]_i$ während eines Experimentes für den FÜ im zeitlichen Verlauf anhand ausgewählter Einzelbilder dargestellt. Die Messintervalle zwischen den Einzelbildern betragen 2 sec., d.h. zwischen 10 Bildern liegt ein Zeitintervall von 20 sec. Die Superfusion des FÜ beginnt bei Bild Nr. 40 und endete bei Bild Nr. 105. Im Versuch wurde der FÜ nun durch Ringer Lösung ersetzt. Durch Regulationsmechanismen kommt es innerhalb von 140 sec. (Bild 175) zu einer Rückregulation der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen zu den Basalwerten.

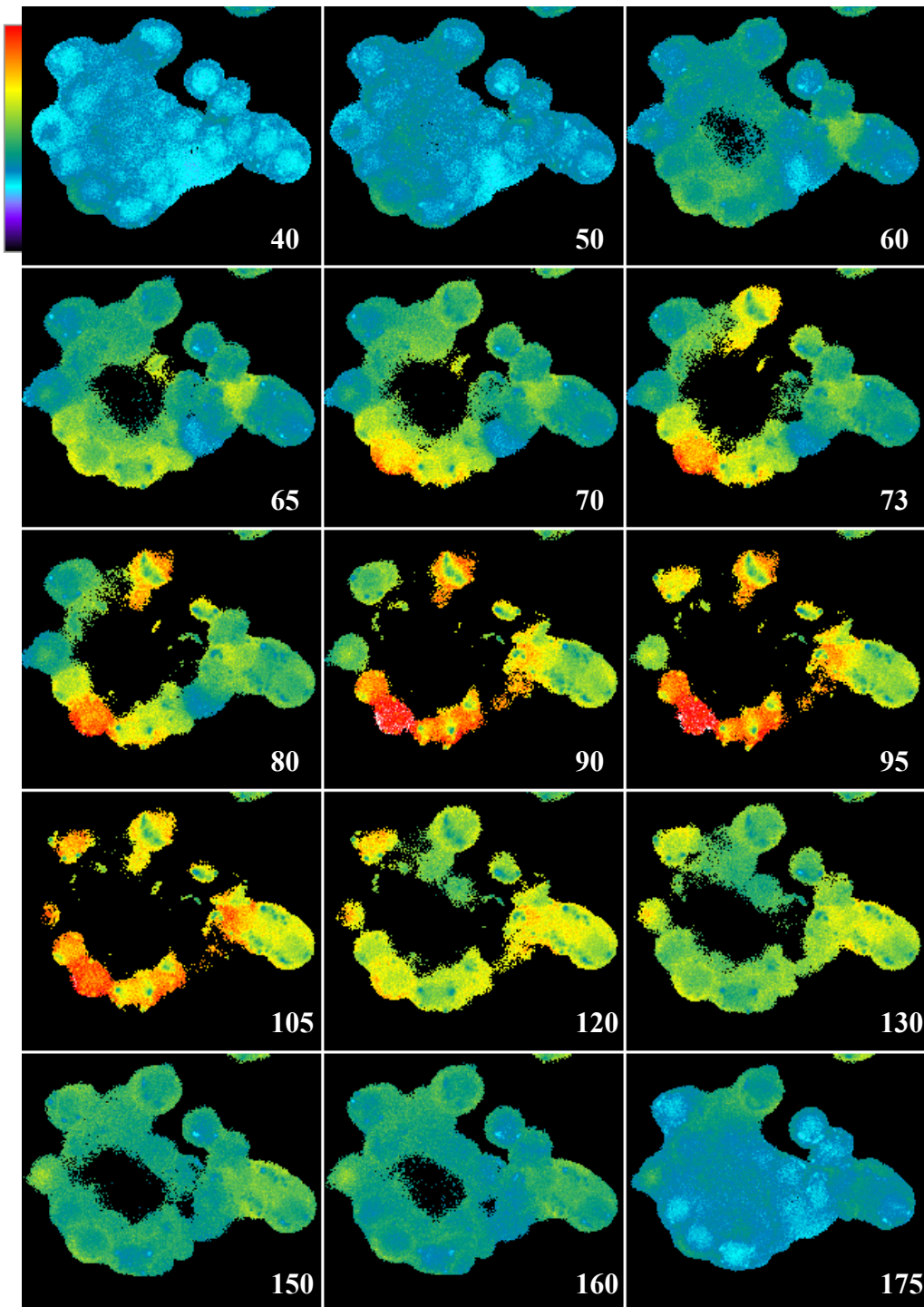


Abb. 4-2 Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ im Zellverband während der Behandlung mit dem FÜ. Die Darstellung zeigt ausgewählte Ratiobilder eines Versuchs im „Pseudocolour“-Modus. Die Messintervalle betragen 2 sec. (20 sec./10 Bilder). Zur Erklärung der Bildnummern siehe Text.

Als zweiter FÜ wurde der FÜ „Kontrolle“ ($[\text{SCFA}] = 7 \text{ mmol/L}$ Endkonzentration) hinsichtlich seiner Effekte auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ untersucht. Er wurde ohne Kohlenhydratzusatz fermentiert und enthielt daher weniger SCFA als der FÜ mit Kohlenhydratzusatz. Er dient als interne Kontrolle des Fermentationsprozesses und gibt Auskunft über die Höhe der SCFA-Konzentration, die in jedem Fermentationsgang auch ohne fermentierbare Kohlenhydrate aufgrund des Stoffwechsels der Mikroorganismen in den Fermentationsüberständen enthalten sind. Die Auswertung erbrachte weder beim Vergleich der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch des pH_i zwischen dem bereits gemessenen FÜ mit dem FÜ „Kontrolle“ signifikante Unterschiede (s. Abb. 4-3). In diesem Vergleich wurde eine Darstellung mit Δ -Werten ausgewählt, um die Varianzen in den jeweiligen Ausgangswerten der Versuche vernachlässigen zu können. Die Tabelle mit den zugehörigen Δ -Werten ist im Anhang C zu finden.

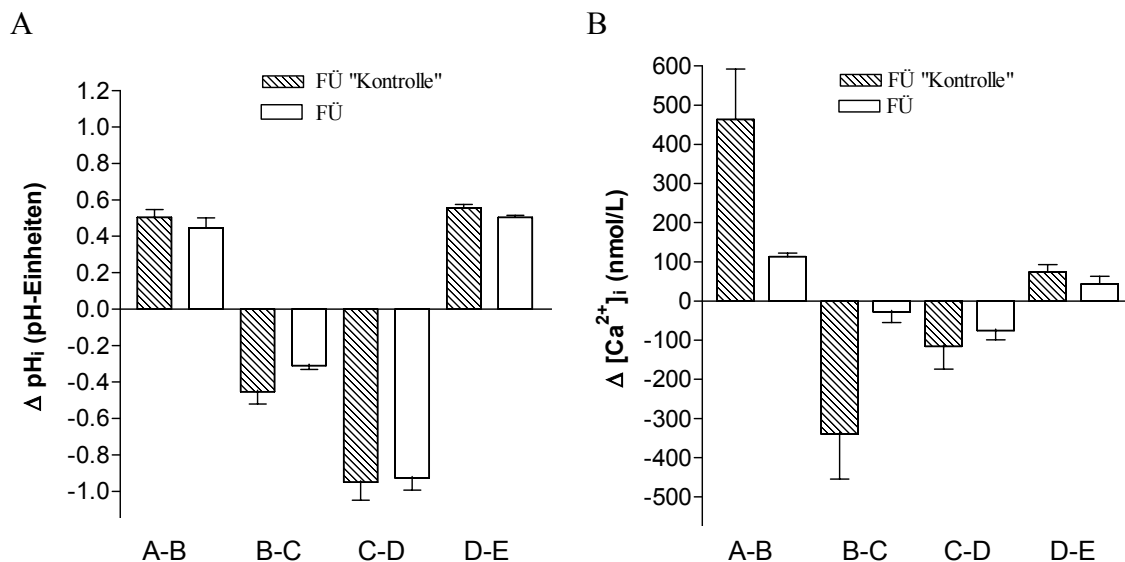


Abb. 4-3 Vergleich von ΔpH_i (A) und $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ (B) zwischen dem FÜ (28,1 mmol/L SCFA) und dem FÜ „Kontrolle“ (7 mmol/L SCFA). Dargestellt sind die $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ($n = 3$). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem FÜ und dem FÜ-„Kontrolle“ in den einzelnen Versuchsabschnitten ermittelt werden. Die p -Werte in den Abschnitten A-B bzw. B-C für die $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ liegen bei $p = 0,054$ bzw. $p = 0,058$.

Der FÜ „Kontrolle“, ohne Kohlenhydratzusatz, beeinflusst den pH_i der HT-29-Zellen in ähnlichem Maß, wie der FÜ mit weitaus höherem Gesamtfettsäuregehalt (28,1 mmol/L Endkonzentration; s. Abb. 4-3 A). Die Δ -Werte des pH_i beider FÜ unterscheiden sich nur gering voneinander. Beim Vergleich der $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ der jeweiligen Versuchsabschnitte zwischen beiden FÜ fällt auf, dass der FÜ „Kontrolle“ zu einer um mehr als 300 nmol/L höheren Änderung der Ca^{2+} -Konzentration führt, als der FÜ, der als Ausgangssubstanz

ein Kohlenhydrat enthielt. Zwischen der Differenz der basalen Ca^{2+} -Konzentration und dem Maximum zu Beginn der Stimulation mit dem FÜ (Abschnitt Δ A-B), sowie zwischen der maximalen und minimalen Ca^{2+} -Konzentration während der Superfusion mit FÜ (Abschnitt Δ B-C) traten sehr hohe Standardabweichung bei der Messung des FÜ „Kontrolle“ auf.

4.1.2 Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) durch EIPA: Effekte auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Superfusion mit dem FÜ

Mit dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob durch EIPA hervorgerufene Veränderungen des pH_i und seiner Regulation auch Effekte auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgeübt werden können. Das Amilorid EIPA ist ein bekannter Inhibitor der Na^+/H^+ -Austauscher 1-3 (NHE 1-3; Noel et al. 1995). Es wurde dem Versuchspuffer sowie der FÜ-Lösung in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ zugesetzt. Durch Hemmung des basolateralen NHE 1, der maßgeblich an der Regulation des pH_i der Kolonepithelzellen beteiligt ist (Bookstein et al. 1994), können azide intrazelluläre pH_i -Werte nicht mehr zu ihrem Ausgangs- pH_i reguliert werden. Protonen verbleiben vermehrt im Zytoplasma. Der den folgenden Ergebnissen zugrundeliegende Versuchsablauf ist in Tab. 4-2 dargestellt.

Tab. 4-2: Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-4. Testsubstanz: Fermentationsüberstand (FÜ) 1:2 verdünnt in Messpuffer, versetzt mit EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$).

Auswertungspunkt	A	B	C	D	E	F	G
Superfusionslösung	Puffer	Puffer +EIPA	FÜ 1:2 +EIPA in Puffer		Puffer +EIPA		Puffer
Zeit (min.)	8	2	6		12/4		15
Messintervall (sec.)	60	60	3/60		3/60		60

Abb. 4-4 A zeigt einen typischen Verlauf für die zeitlichen Zusammenhänge von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter dem Einfluss des Fermentationsüberstandes zusammen mit dem NHE-Hemmstoff EIPA.

A

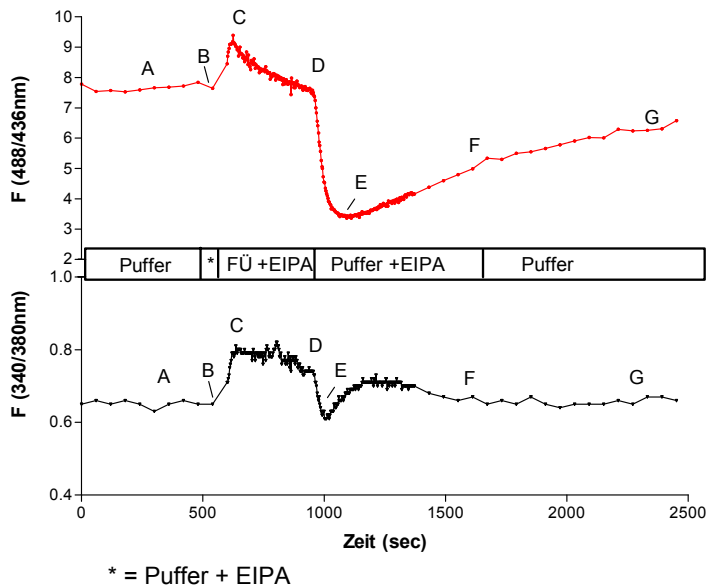


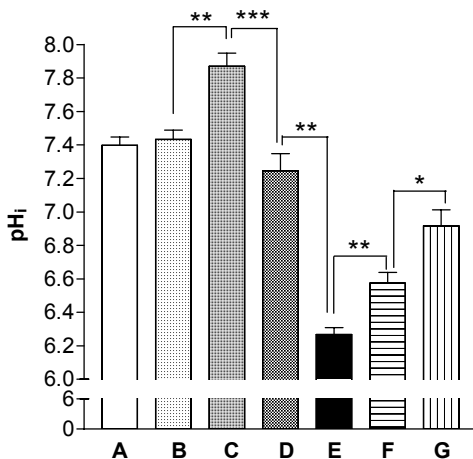
Abb. 4-4

Effekte des Fermentationsüberstandes (1:2 verdünnt) versetzt mit EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) auf den pH_i (obere Abb.) und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (untere Abb.).

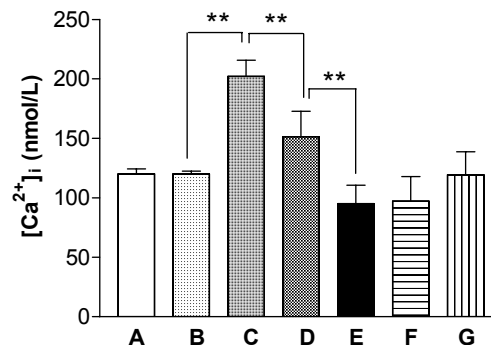
A: Dargestellt sind die MW aus 7 Zellen eines repräsentativen Versuches. Die Messung erfolgte mit der kombinierten Methode beider Parameter. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen auf die Darstellung der SEM verzichtet. Die Buchstaben bezeichnen charakteristische Punkte der Auswertung (siehe Text und Kap. 4.1).

B und C: Zusammenfassung der pH_i - (B) und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte (C) vor und nach der Superfusion mit FÜ + EIPA ($n=4$). Signifikanzniveaus: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

B



C



Die Versuche zeigen, dass die Inhibierung des NHE Effekte auf die pH_i -Regulation ausübt (s. unten). Wie bereits in Versuchen ohne EIPA gezeigt werden konnte, kommt es auch hier zu einem sehr ähnlichen Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung. Einem signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 120 ± 2 nmol/L auf 202 ± 13 nmol/L (Abschnitt B-C, $p \leq 0,01$) folgt auch hier eine Plateau-ähnliche Phase. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist also unabhängig von der Inhibition des NHE. Im Abschnitt E, die Zellen werden hier nicht mehr mit FÜ umspült, stehen jedoch noch unter EIPA-Einfluss, sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant unter die Ausgangswerte ab (95 ± 15 nmol/L; $p \leq 0,01$). An den transienten pH_i -Anstieg im Abschnitt E-F (von $6,27 \pm 0,04$ auf $6,58 \pm 0,06$; $p \leq 0,01$) ist zeitlich ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gebunden. Die Inhibition des NHE ist reversibel, was sich im

Anstieg der pH_i -Werte der HT-29 Zellen nach dem Ersetzen des EIPA-haltigen Puffers durch Inhibitor-freien Puffer zeigt.

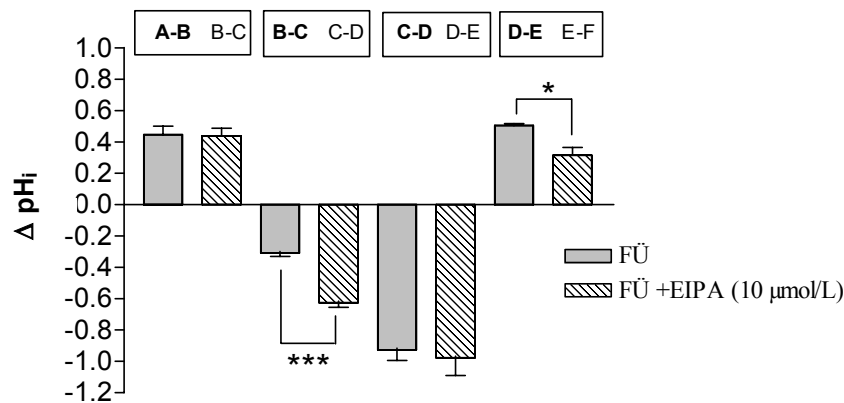


Abb. 4-5 Vergleich der ΔpH_i -Änderungen nach Superfusion von HT-29-Zellen mit dem Fermentationsüberstand bzw. dem Fermentationsüberstand in Kombination mit der Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers (FÜ + EIPA 10 $\mu\text{mol/L}$).

Beide FÜ-Lösungen wurden 1:2 verdünnt. Die erstgenannten, dick gedruckten, Wertepaare geben die Δ -Werte aus den Versuchen ohne EIPA an (Buchstaben entsprechend der Versuchsabschnitte in Abb. 4-1), die zweitgenannten, zugehörigen Wertepaare stammen aus den Versuchen mit EIPA (Buchstaben entsprechend der Versuchsabschnitte in Abb. 4-4). Signifikanzniveaus: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Beim Vergleich der Δ -Werte des pH_i (s. Abb. 4-5) zeigt sich, dass der Alkalisierungsgang des pH_i zu Beginn der Stimulation mit dem FÜ durch den NHE-Inhibitor EIPA unbeeinflusst bleibt (Abschnitt **A-B** B-C). Der ΔpH_i beträgt beim FÜ alleine $0,45 \pm 0,05$, beim FÜ, der mit EIPA versetzt wurde $0,44 \pm 0,05$ pH-Einheiten (Abschnitt A-B). Durch Einsatz des Hemmstoffs EIPA kommt es in der nächsten Versuchsphase, während der Behandlung der Zellen mit dem FÜ zu einer hochsignifikanten Verdoppelung der ΔpH_i -Erniedrigung von $-0,31 \pm 0,02$ auf $-0,63 \pm 0,03$ pH-Einheiten (Abschnitt **B-C** C-D; $p \leq 0,001$). Die sich anschließende Azidifizierung des pH_i beträgt ohne Hemmstoff $-0,93 \pm 0,07$, mit Hemmstoff $-0,98 \pm 0,11$ pH-Einheiten, sie ist EIPA-unabhängig (Abschnitt **C-D** D-E). Während die Werte für ΔpH_i mit herkömmlichem Messpuffer aufgrund intakter Regulationsmechanismen rasch wieder zurückreguliert werden ($\Delta \text{pH}_i = 0,50 \pm 0,01$ pH-Einheiten), ist die Regulation des pH_i während der Superfusion mit Puffer + EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) zu 36 % signifikant gehemmt ($\Delta \text{pH}_i = 0,32 \pm 0,05$ pH-Einheiten; $p \leq 0,05$; Abschnitt **D-E** E-F).

Alle zugehörigen Messwerte befinden sich im Anhang C.

4.1.3 Hemmung der FÜ-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Ca^{2+} -freien Puffer und den Chelatbildner EGTA

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Alkalisierung des pH_i von einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ begleitet wird, wurde untersucht, ob es auch ohne freie Ca^{2+} -Ionen in den Versuchslösungen zum Anstieg der Ca^{2+} -Signalmoleküle kommt. Folgende Versuchsreihe (s. Tab. 4-3) diente der Untersuchung, ob die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern oder einen Einstrom extrazellulärer Ionen vermittelt ist. Hierfür wurde $CaCl_2$ im Versuchspuffer äquimolar durch $MgCl_2$ ersetzt. Zusätzlich wurden 2 mmol/L EGTA hinzugefügt, da im FÜ herstellungsbedingt Ca^{2+} -Ionen enthalten waren, die durch die 1:2-Verdünnung mit Puffer gebunden werden sollten, um für einen Einstrom in das Zytoplasma nicht mehr zur Verfügung zu stehen.

Tab. 4-3: *Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-6. Testsubstanz: Fermentationsüberstand (FÜ) 1:2 verdünnt in Ca^{2+} -freiem Messpuffer + EGTA (2 mmol/L).*

Auswertungspunkt	A	B	C	D	E	F	G
Superfusionslösung	Puffer	Puffer $-Ca^{2+}$ +EGTA	FÜ 1:2 in Puffer $-Ca^{2+}$ +EGTA		Puffer $-Ca^{2+}$ +EGTA		Puffer
Zeit (min.)	4	6	6		4/12		10
Messintervall (sec.)	60	60	3/60		3/60		60

Zunächst wurden die Zellen mit unverändertem Messpuffer umspült. Es schloss sich eine Phase mit Ca^{2+} -freiem Puffer + EGTA (2 mmol/L) an, woraufhin die Superfusion des in gleicher Lösung verdünntem FÜ folgte. Zum Abschluss des Versuchs wurde diese Lösung durch unveränderten Messpuffer ersetzt. Abb. 4-6 A zeigt einen typischen Verlauf der Änderungen von pH_i und $[Ca^{2+}]_i$.

Zunächst lässt sich im Verlauf des pH_i -Graphen das bereits charakteristische Alkalisierungs- und Azidifizierungsmuster erkennen. Der Ca^{2+} -freie Puffer + EGTA (2 mmol/L) bewirkt keinerlei Änderung des pH_i hinsichtlich der Basalwerte. Während der Behandlung der Zellen mit dem FÜ kommt es zunächst zu einer hochsignifikanten Alkalisierung ($p \leq 0,001$), die in Verbindung mit Ca^{2+} -freier Pufferlösung und dem Chelator EGTA jedoch weniger stark ausgeprägt ist (der maximale pH_i beträgt hier $7,45 \pm 0,03$). Es folgt die charakteristische, FÜ-vermittelte absinkende Plateauphase (Abschnitt C-D von $7,45 \pm 0,03$ auf $7,13 \pm 0,03$; $p \leq 0,01$) und die Azidifizierung (minimaler pH_i nach Ausspülen des FÜ: $6,58 \pm 0,03$).

A

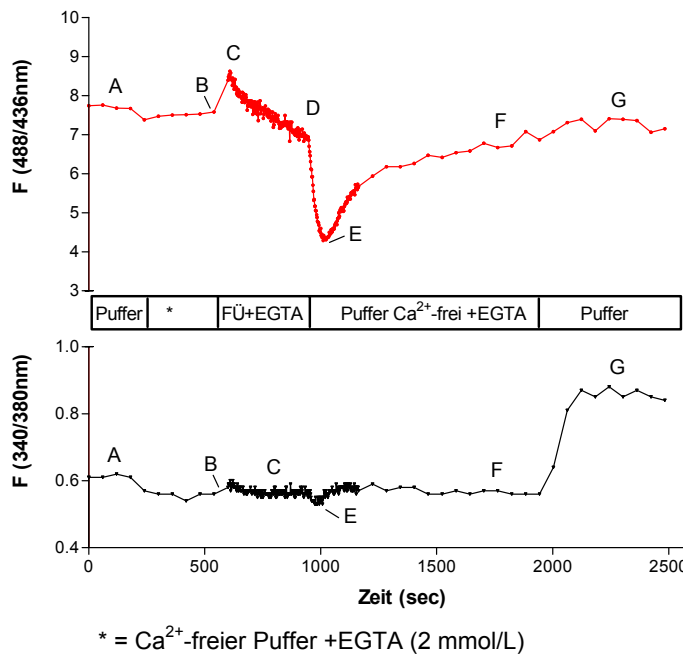


Abb. 4-6

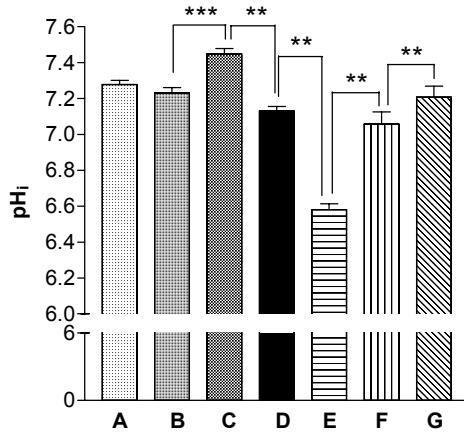
Effekte des Fermentationsüberstandes in Ca²⁺-freiem Puffer (1:2 verdünnt) versetzt mit EGTA (2 mmol/L) auf den pH_i (obere Abb.) und die [Ca²⁺]_i (untere Abb.). Aufgrund gleichbleibender [Ca²⁺]_i wurden hier die Abschnitte C und D zusammengefasst (s. Kap. 4.1).

A: Dargestellt sind die MW aus 7 Zellen eines repräsentativen Versuches. Die Messung erfolgte mit der kombinierten Methode beider Parameter. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen auf die Darstellung der SEM verzichtet. Die Buchstaben bezeichnen charakteristische Punkte der Auswertung (s. Text und Kap. 4.1). B und C: Zusammenfassung der pH_i- (B) und [Ca²⁺]_i-Werte (C) vor und nach der Superfusion mit dem FÜ in Ca²⁺-freiem Puffer+EGTA (n=3).

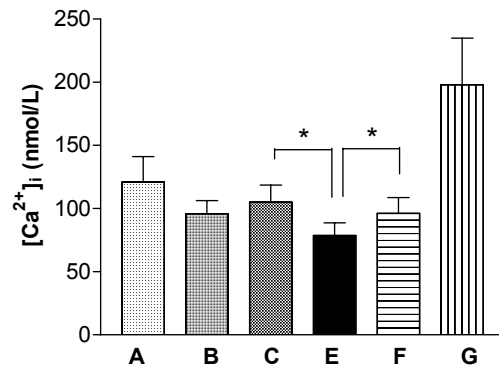
Signifikanzniveau:

* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.

B



C



Der Vergleich der ΔpH_i-Werte während der Alkalisierung zeigt, dass es in den Experimenten mit Ca²⁺-freiem, EGTA-haltigem Puffer zu einem um 50 % reduzierten Anstieg des ΔpH_i kommt, als in den Experimenten in Ca²⁺-haltiger, EGTA-freier Pufferlösung (Abb. 4-7, Abschnitt A-B B-C: 0,22 ± 0,003 ΔpH-Einheiten gegenüber 0,45 ± 0,06 mit der Ca²⁺-haltigen FÜ-Lösung; p ≤ 0,05; s. auch Kap. 4.1.1).

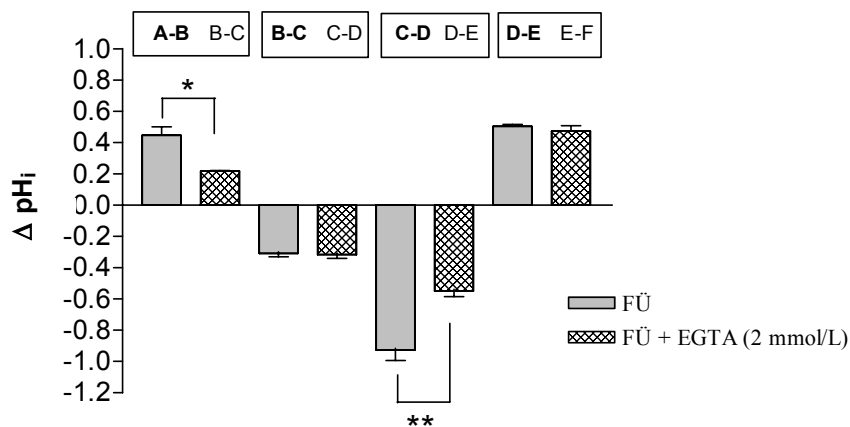


Abb. 4-7 Vergleich der $\Delta p\text{H}_i$ -Änderungen nach Superfusion von HT-29-Zellen mit dem Fermentationsüberstand bzw. dem Fermentationsüberstand in Ca^{2+} -freier, EGTA-haltigem Puffer (FÜ + EGTA 2 mmol/L).

Beide FÜ-Lösungen wurden 1:2 verdünnt. Die erstgenannten, dick gedruckten, Wertepaare geben die Δ -Werte aus den Versuchen ohne EGTA an (Buchstaben entsprechend der Versuchsabschnitte in Abb. 4-1), die zweitgenannten, zugehörigen Wertepaare stammen aus den Versuchen mit EGTA (Buchstaben entsprechend der Versuchsabschnitte in Abb. 4-6). Signifikanzniveaus: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Beim Einsatz des FÜ ohne Hemmstoff betragen die $\Delta p\text{H}_i$ -Werte $0,45 \pm 0,05$ Einheiten. Bei der Betrachtung und dem Vergleich des abfallenden intrazellulären pH-Wertes im Abschnitt B-C dieser Versuche mit denen ohne Inhibitoren fiel ein genau identischer Abfall des $\Delta p\text{H}_i$ um $-0,32 \pm 0,02$ pH-Einheiten auf. Der signifikante Abfall des $\Delta p\text{H}_i$ während der Azidifizierung nach Stimuluswegnahme im Abschnitt D-E beträgt hier hingegen nur $-0,55 \pm 0,04$ pH-Einheiten gegenüber $-0,93 \pm 0,07$ ohne Hemmstoff.

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, welche zu Beginn der Experimente 120 ± 20 nmol/L beträgt, sank durch die Behandlung mit Ca^{2+} -freiem Puffer + EGTA auf 96 ± 10 nmol/L ab (Abschnitt A-B). Die signifikante Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Superfusion mit dem FÜ ist in EGTA-haltiger, Ca^{2+} -freier Lösung nicht zu beobachten. Die Messwerte bleiben im Abschnitt C auf dem Niveau von 105 ± 14 nmol/L und sinken unabhängig von der Azidifizierung des pH_i nach Ausspülen des FÜ zeitgleich signifikant ($p \leq 0,05$) ab. Sofort nach dem Austausch der mit EGTA-versetzten Ca^{2+} -freien Lösung durch unveränderten Messpuffer im Versuchsabschnitt F steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über die Basalwerte hinaus an. Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen in den HT-29-Zellen durch einen Einstrom aus der extrazellulären Flüssigkeit bereitgestellt werden. Die Messwerte zu den einzelnen Versuchsabschnitten sind im Anhang C zusammengefasst.

4.1.4 Regulation von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Superfusion mit äquimolaren SCFA-Gemischen

Da für unverdauliche Kohlenhydrate, nach ihrer mikrobiellen Fermentation zu kurzkettigen Fettsäuren, krebspräventive Effekte postuliert werden, war von Bedeutung, ob reine SCFA-Gemische identische Effekte auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausüben würden wie die FÜ. Hierzu wurden ergänzende Experimente mit den äquimolaren SCFA-Gemischen zum FÜ bzw. FÜ „Kontrolle“ durchgeführt. Der Versuchsablauf entsprach dabei dem unter Kap. 4.1.1 (s. auch Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-8.
Testsubstanz: SCFA-Gemisch 1:2 verdünnt in Messpuffer.

Auswertungspunkt	A	B	C	D	E
Superfusionslösung	Puffer	SCFA 1:2 in Puffer		Puffer	
Zeit (min.)	10	6		20	
Messintervall (sec.)	60	3/60		3/60	

Die Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von denen des FÜ (s. Abb. 4-1). Während die Behandlung der Zellen mit dem FÜ zu einer schnellen, signifikanten Alkalisierung des pH_i , verbunden mit einer signifikanten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, führt, bewirkt die Behandlung der Zellen mit dem äquimolaren SCFA-Gemisch eine transiente intrazelluläre Ansäuerung von $\text{pH} 7,40 \pm 0,08$ auf $7,09 \pm 0,06$ (Abb. 4-8, Abschnitt A-B, $\Delta\text{pH} = 0,31 \pm 0,04$ Einheiten; $p \leq 0,001$). Zeitlich gebunden kommt es zu einer signifikanten Verringerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 133 ± 12 nmol/L auf 105 ± 8 nmol/L (Abschnitt A-B, $p \leq 0,01$). Während der 6-minütigen Behandlungszeit mit dem SCFA-Gemisch erfolgt die Annäherung des pH_i zurück zu den Ausgangswerten (von $7,09 \pm 0,06$ auf $7,26 \pm 0,08$; Abschnitt B-C), gleichzeitig kommt es zu einem langsamen, aber signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (von 105 ± 8 auf 141 ± 9 nmol/L; $p \leq 0,01$). Nach dem Ausspülen der SCFA-Lösung findet aufgrund der zellulären Regulationsmechanismen ein „overshoot“, sowohl des pH_i als auch der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ statt (Abschnitt C-D; $p \leq 0,001$). Die Konzentration der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen steigt dabei im Mittel um ca. 100 nmol/L an. Beide Parameter können durch das anhaltende Umspülen der Zellen mit Messpuffer in ihre Ausgangsposition zurückreguliert werden.

Die Ergebnisse führten zu einem dazu, dass analog den Versuchen mit dem FÜ auch die SCFA-Gemische näher untersucht wurden, um die Zusammenhänge zwischen pH_i

und $[Ca^{2+}]_i$ zu charakterisieren. Zum anderen wurde begonnen, mögliche Ursachen für die divergierenden Ergebnisse zwischen FÜ und SCFA-Gemisch zu betrachten.

A

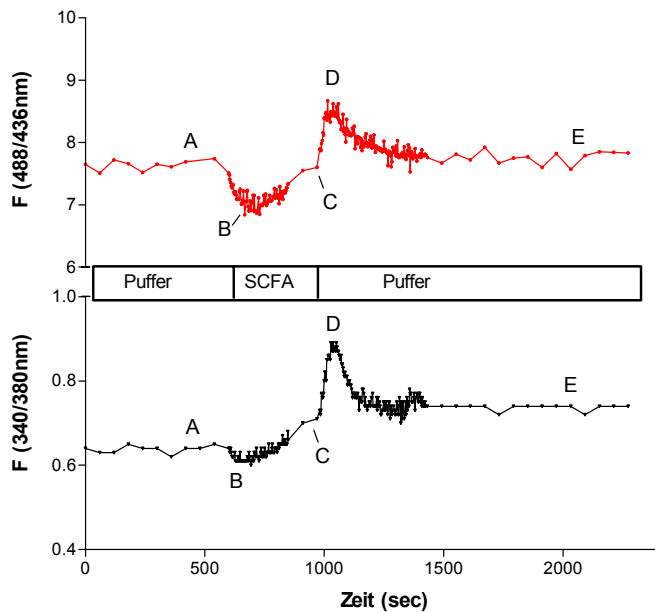


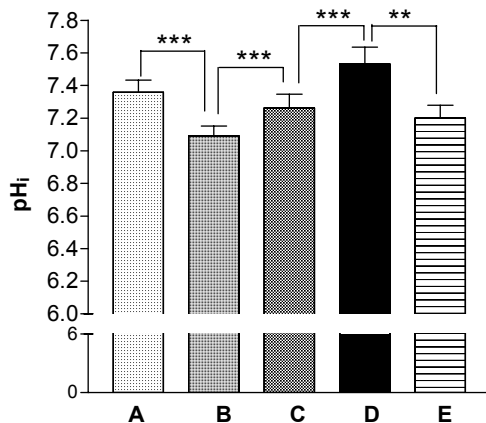
Abb. 4-8

Effekte des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt) auf den pH_i (obere Abb.) und die $[Ca^{2+}]_i$ (untere Abb.). $[SCFA] = 28,1 \text{ mmol/L}$.

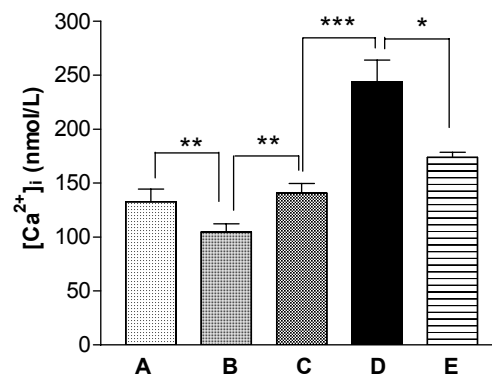
A: Dargestellt sind die MW aus 7 Zellen eines repräsentativen Versuches. Die Messung erfolgte mit der kombinierten Methode beider Parameter. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen auf die Darstellung der SEM verzichtet. Die Buchstaben bezeichnen charakteristische Punkte der Auswertung (siehe Text und Kap. 4.1). B und C: Zusammenfassung der pH_i - (B) und $[Ca^{2+}]_i$ -Werte (C) vor und nach der Superfusion mit dem SCFA-Gemisch ($n=7$). Signifikanzniveaus:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

B



C



Zusätzlich wurde das SCFA-Gemisch „Kontrolle“ analog dem FÜ „Kontrolle“ in die Versuche miteinbezogen ($SCFA$ -Endkonzentration = 7 mmol/L). Die Änderungen des pH_i und der $[Ca^{2+}]_i$ während der Superfusion der Zellen mit diesem SCFA-Kontrollgemisch waren gering. Die Azidifizierung fiel weniger ausgeprägt aus, darüber hinaus kam es bei keinem der beiden Parameter zu „overshoots“ (s. Abb. 4-9; Basiswert des pH_i : Punkt A: $7,26 \pm 0,08$; Punkt B: $7,24 \pm 0,09$). Der pH_i sank im Abschnitt C-D,

an dem der „overshoot“ erwartet wurde, sogar signifikant von $7,20 \pm 0,14$ auf $7,09 \pm 0,14$ ($p \leq 0,001$). Die Messwerte zu den SCFA-Gemischen sind im Anhang C aufgeführt.

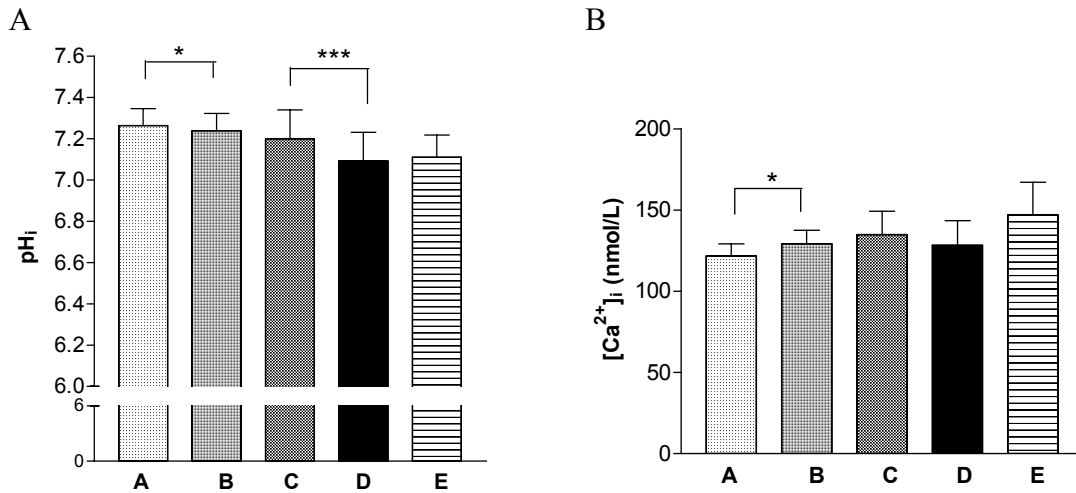


Abb. 4-9 Zusammenfassung der Effekte des SCFA-Gemisches analog dem FÜ „Kontrolle“ (1:2 verdünnt) auf die pH_i - (A) und $[Ca^{2+}]_i$ -Werte (B) vor und nach der Superfusion mit dem SCFA-Gemisch ($n=5$). Signifikanzniveaus: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.1.5 EIPA-unabhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch das SCFA-Gemisch bei inhibierter pH_i -Regulation

In der nachfolgenden Versuchsreihe wurde der NHE-Inhibitor EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) in Kombination mit dem SCFA-Gemisch eingesetzt. Analog den Versuchen mit dem FÜ sollte untersucht werden, ob die Regulation des pH_i durch EIPA unterbunden werden kann und Änderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ damit in Zusammenhang gebracht werden können. Der Versuchsablauf entsprach dem in Kap. 4.1.2 (s. auch Tab. 4-5). Die Ergebnisse sind in Abb. 4-10 dargestellt.

Tab. 4-5: Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-10. Testsubstanz: SCFA-Gemisch 1:2 verdünnt in Messpuffer, versetzt mit EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$).

Auswertungspunkt	A	B	C	D	E	F	G
Superfusionslösung	Puffer	Puffer +EIPA	SCFA 1:2 +EIPA in Puffer		Puffer +EIPA		Puffer
Zeit (min.)	8	2	6		4		14
Messintervall (sec.)	60	60	3		3/60		60

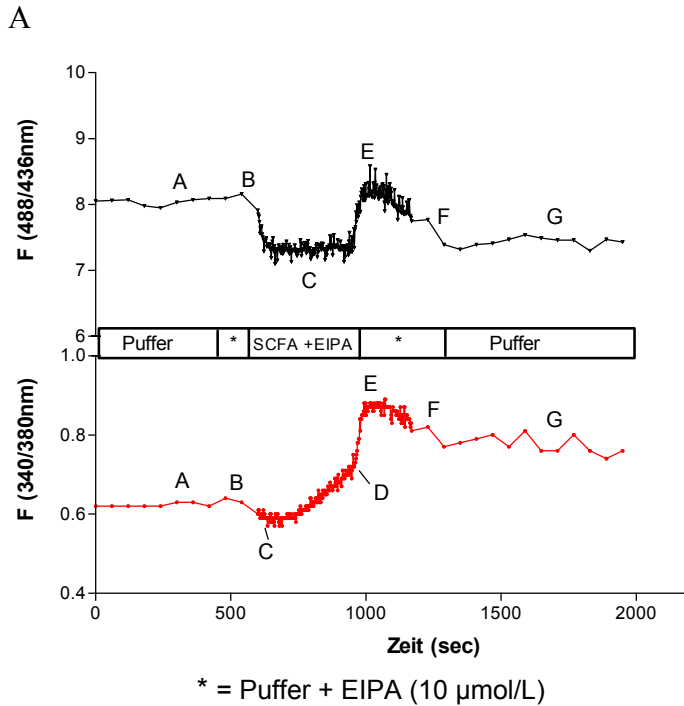


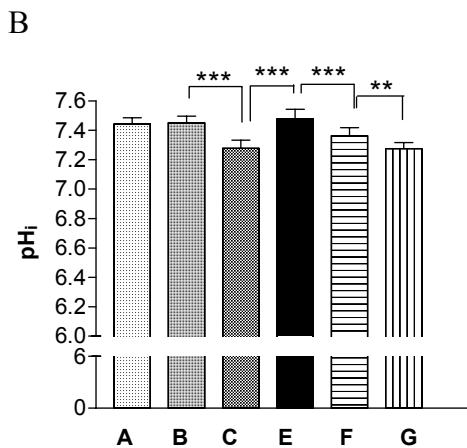
Abb. 4-10

Effekte des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt)+EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) auf den pH_i (obere Abb.) und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (untere Abb.).

Aufgrund gleichbleibender pH_i -Werte während der Inhibierung des NHE durch EIPA wurden die Abschnitte C und D des pH_i zusammengefasst (s. auch Kap. 4.1).

A: Dargestellt sind die MW aus 7 Zellen eines repräsentativen Versuches. Die Messung erfolgte mit der kombinierten Methode beider Parameter. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen auf die Darstellung der SEM verzichtet. Die Buchstaben bezeichnen charakteristische Punkte der Auswertung (siehe Text und Kap. 4.1).

B und C: Zusammenfassung der pH_i - (B) und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte (C) vor und nach der Superfusion mit dem SCFA-Gemisch ($n=6$). Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Die Regulation des pH_i bei der Behandlung mit dem SCFA-Gemisch wird durch den NHE-Inhibitor EIPA in HT-29-Karzinomzellen völlig unterbunden (Abschnitt C). Der pH_i bleibt während der gesamten Inkubationszeit von 6 min. hochsignifikant um $0,17 \pm 0,02 \Delta\text{pH}_i$ -Einheiten gegenüber den Ausgangswerten erniedrigt (Abschnitt B-C, pH_i : $7,45 \pm 0,05$ auf $7,28 \pm 0,05$; $p \leq 0,001$). Die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen steigt jedoch wie bereits in Kap. 4.1.4 beschreiben, signifikant an (mit EIPA: $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 26 \pm 8 \text{ nmol/L}$; s. Abb. 4-10, Abschnitt C-D; ohne EIPA: $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 36 \pm 10 \text{ nmol/L}$; s. Abb. 4-8, Abschnitt B-C).

Unterschiede zur Versuchsreihe des SCFA-Gemisches ohne NHE-Inhibitor sind jedoch im anschließenden „overshoot“ zu beobachten (Abschnitt D-E des $[Ca^{2+}]_i$ -Graphen bzw. Abschnitt C-E des pH_i -Graphen): Während es ohne Hemmstoff zu einem schnellen, hochsignifikanten „overshoot“ des pH_i von $0,27 \pm 0,03 \Delta pH_i$ -Einheiten kommt, ist mit dem NHE-Inhibitor EIPA ein geringerer Anstieg von $0,20 \pm 0,02 \Delta pH_i$ -Einheiten, der aber auch hochsignifikant ist, nachweisbar ($p \leq 0,001$). Während die $[Ca^{2+}]_i$ nach der SCFA-Superfusion ohne EIPA von 141 ± 9 auf 244 ± 20 nmol/L ansteigt ($\Delta = 103 \pm 17$ nmol/L; s. Abb. 4-8, Abschnitt C-D), wird der Konzentrationsanstieg mit dem Inhibitor EIPA um fast 50 % gehemmt, von 121 ± 10 auf 177 ± 26 nmol/L ($\Delta = 56 \pm 16$ nmol/L; s. Abb. 4-10, Abschnitt D-E; $p \leq 0,05$). Für die Messwerte der einzelnen Abschnitte sei auf Anhang C verwiesen.

4.1.6 Inhibition des SCFA-vermittelten Ca^{2+} -Erhöhung durch Ca^{2+} -freie Lösungen und EGTA

Mit den Experimenten des FÜ, verdünnt mit Ca^{2+} -freiem, EGTA-haltigem Messpuffer zur Komplexierung der Ca^{2+} -Ionen im FÜ (s. Kap. 4.1.3), konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zur Signaltransduktion auf einem Einstrom extrazellulär vorhandener Ca^{2+} -Ionen beruht. Mit der nachfolgenden Experimentserie sollte untersucht werden, ob die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, vermittelt durch das analoge Gemisch aus SCFA (28,1 mmol/L Endkonzentration), ebenfalls durch extrazellulär einströmende Ca^{2+} -Ionen hervorgerufen wird und somit zur Stützung der FÜ-Ergebnisse beitragen kann.

Tab. 4-6 zeigt den zu 4.1.3 weitgehend identischen Versuchsablauf, in Abb. 4-11 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe dargestellt.

Tab. 4-6: Versuchsablauf und Auswertungspunkte zu Abb. 4-11. Testsubstanz: SCFA-Gemisch 1:2 verdünnt in Ca^{2+} -freiem Messpuffer, versetzt mit EGTA (2 mmol/L).

Auswertungspunkt	A	B	C	D	E	F	G
Superfusionslösung	Puffer	Puffer $-Ca^{2+}$ +EGTA	SCFA 1:2 in Puffer $-Ca^{2+}$ +EGTA		Puffer $-Ca^{2+}$ +EGTA		Puffer
Zeit (min.)	3	7		6		3/14	10
Messintervall (sec.)	60	60		3/60		3/60	60

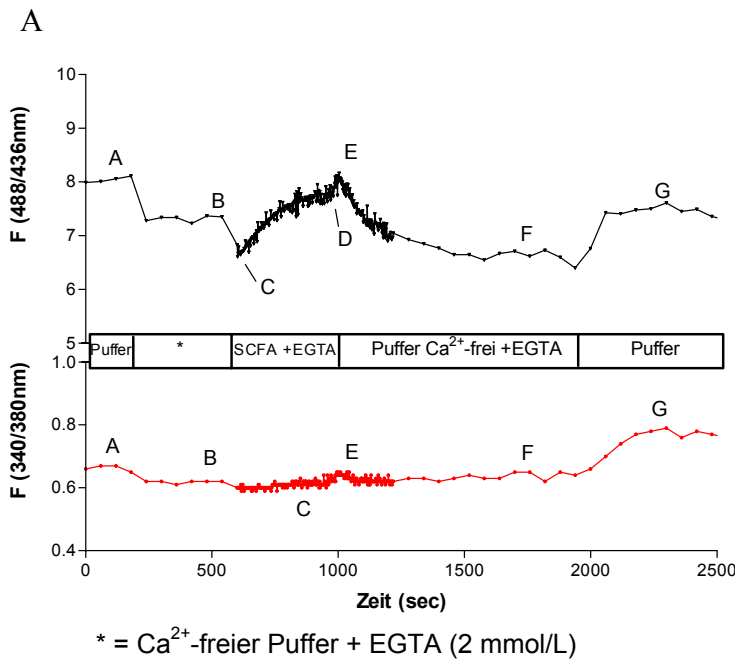
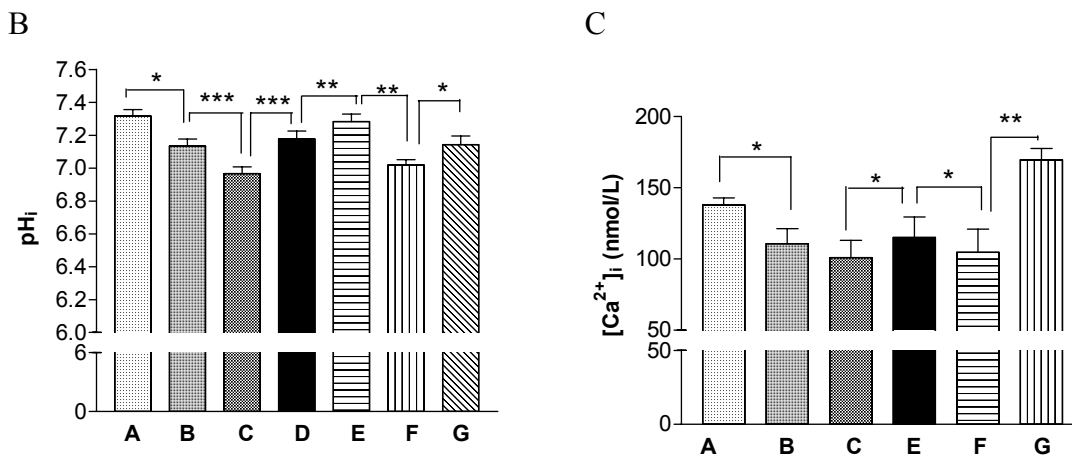


Abb. 4-11

Effekte des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt) in Ca²⁺-freiem Puffer +EGTA (2 mmol/L) auf den pH_i (obere Abb.) und die [Ca²⁺]_i (untere Abb.). Aufgrund gleich-bleibender [Ca²⁺]_i-Werte in den Abschnitte C und D wurden diese zusammengefasst.

A: Dargestellt sind die MW aus 7 Zellen eines repräsentativen Versuches. Die Messung erfolgte mit der kombinierten Methode beider Parameter. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen auf die Darstellung der SEM verzichtet. Die Buchstaben bezeichnen charakteristische Punkte der Auswertung (s. Text und Kap. 4.1).



B und C: Zusammenfassung der pH_i- (B) und [Ca²⁺]_i-Werte (C) vor und nach der Superfusion mit dem SCFA-Gemisch (n=5). Signifikanzniveaus: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.

Während der Behandlung mit dem SCFA-Gemisch in Ca²⁺-freier Lösung + EGTA (2 mmol/L) kam es trotz charakteristischer pH_i-Veränderungen zu keinem Anstieg der Konzentration an Ca²⁺-Ionen. Die Werte sinken bis zum Abschnitt C ab. Lediglich nach Ausspülen der Fettsäuren mit Ca²⁺-freier Lösung + EGTA steigt die [Ca²⁺]_i von 101 ± 12 auf 115 ± 14 nmol/L an (Δ = 14 ± 3 nmol/L ; s. Abb. 4-11, Abschnitt C-E). Sie wird von einem signifikanten Anstieg des pH_i von 7,18 ± 0,05 auf 7,28 ± 0,05 begleitet (ΔpH_i = 0,11 ± 0,02; s. Abschnitt D-E; p ≤ 0,01).

Am Ende der Versuche steigt die intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen durch die Aufnahme von Ca²⁺-Ionen aus der extrazellulären Lösung an, der pH_i wird seinen

Ausgangswerten entsprechend hoch reguliert (Abschnitt G). Mit den Versuchen in Ca^{2+} -freiem, EGTA-haltigem Messpuffer konnte bestätigt werden, dass die SCFA-vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Signaltransduktion durch den Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen ermöglicht wird. Wie für alle Versuche befinden sich auch die Messwerte dieser Versuchsreihe im Anhang C.

4.2 Charakterisierung der FÜ-Zusammensetzung zur Klärung der divergierenden Ergebnisse zwischen FÜ und SCFA-Gemisch

Wie mit den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt wurde, führen das SCFA-Gemisch und der FÜ zu divergierenden Ergebnissen hinsichtlich ihrer Wirkung auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die FÜ wurden daher hinsichtlich ihre Zusammensetzung näher charakterisiert, um mögliche Stoffgruppen zu identifizieren, die den Effekten zugrunde liegen.

4.2.1 Ermittlung der biogenen Amin-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentrationen biogener Amine in den FÜ (**Histamin, Putrescin, Cadaverin, Tyramin, Spermidin, Spermin und Phenylethylamin**) erfolgte mittels Reversed Phase-HPLC nach Kirschbaum et al. (1994) nach der Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethyl Chloroformiat (FMOC-Cl; s. auch Kap. 3.5) innerhalb von 45 min.

Die Amingehalte in den FÜ waren gering, s. Tab. 4-7. Putrescin und Cadaverin waren die Hauptamine in den FÜ. Tyramin kam in geringeren Dosen, Phenylethylamin in Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenzen vor. Spermin, Spermidin und Histamin konnten mit der Methode nicht in den FÜ nachgewiesen werden bzw. die Werte lagen unter den jeweiligen Bestimmungsgrenzen. Abb. 4-12 zeigt Beispiel-Chromatogramme des Aminstandards (100 $\mu\text{mol/L}$) und des gemessenen FÜ.

Tab. 4-7: Aminkonzentrationen der Fermentationsüberstände [$\mu\text{g/mL}$]. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$; n.d. = nicht detektiert

Amin	FÜ	FÜ „Kontrolle“
Phenylethylamin	$0,28 \pm 0,40$	$0,14 \pm 0,19$
Putrescin	$16,62 \pm 3,31$	$13,33 \pm 0,49$
Histamin	n.d.	n.d.
Cadaverin	$17,72 \pm 2,98$	$30,23 \pm 9,35$
Tyramin	$5,12 \pm 1,37$	$8,09 \pm 1,99$
Spermidin	n.d.	n.d.
Spermin	n.d.	n.d.

A

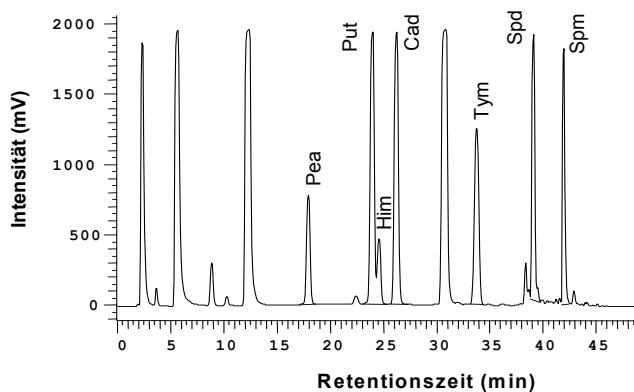
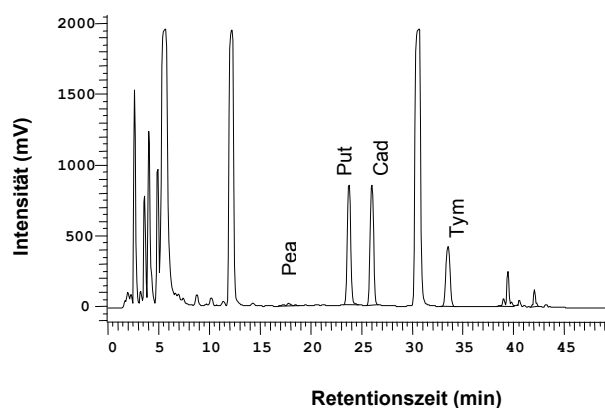


Abb. 4-12
Chromatogramme des Amin-
standards $100 \mu\text{mol/L}$ (A) und des
FÜ 1:2 verdünnt in $0,1 \text{ M HCl}$ (B).

B



Abk.: Pea = Phenylethylamin
Put = Putrescin
Him = Histamin
Cad = Cadaverin
Tym = Tyramin
Spd = Spermidin
Spm = Spermin

4.2.2 Effekte von biogenen Aminen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Die jeweils höchsten gemessenen Konzentrationen der detektierten Amine wurden in Ringer Lösung angesetzt, um ihre Effekte auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu untersuchen.

Keines der Amine bewirkte in der eingesetzten Konzentration nach 4-minütiger Behandlungszeit eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Während der gesamten Messdauer blieben die Werte auf dem Basalniveau. Als Positivkontrolle wurden die Zellen am Ende der

Versuche mit dem Peptid Neurotensin (100 nmol/L) stimuliert (Turner et al. 1990, Leipziger et al. 1991, Nitschke et al. 1993; Benning et al. 1996), was zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führte.

4.2.3 Gehalte mikrobieller Endotoxine

Nach Etablierung des chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL-Test) zur Bestimmung der Endotoxingehalte der beiden FÜ (s. auch Kap. 3.6), konnten die in Tab. 4-8 dargestellten Konzentrationen (Mittelwert aus zwei Messungen) ermittelt werden. Die FÜ mussten für die Bestimmung bis 1:5000 verdünnt werden, um Messwerte innerhalb des messbaren Bereichs der E. Coli-Toxin-Standards (maximale E. Coli-Toxin-Konzentration = 1,0 EU/mL) zu erhalten.

Tab. 4-8: Endotoxingehalt (MW) der Fermentationsüberstände [EU/mL].
EU = Endotoxin-Unit; n = 2

	Endotoxinkonzentration [EU/mL]
FÜ	1757
FÜ „Kontrolle“	243

4.2.4 Effekte von Endotoxin (Stamm O55:B5) auf die $[Ca^{2+}]_i$

Die ermittelten Endotoxinkonzentrationen der FÜ lagen im Bereich zwischen 200 und 1760 EU/ml. Die HT-29-Zellen wurden daher mit E. coli Endotoxin (Stamm: O55:B5) der Konzentrationen 100, 600, 1000 und 5000 EU/ml in Messpuffer superfundiert, um die Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$ zu untersuchen.

Bei keiner der eingesetzten Endotoxinkonzentrationen konnte ein Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden. Die Fluoreszenzratiowerte blieben, wie schon bei den Aminmessungen (s. Kap. 4.2.2), im basalen Bereich (s. Abb. 4-13). Die Ergebnisse wurden am Ende jedes Experimentes mit der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch einen Stimulus mit Neurotensin (100 nmol/L) verifiziert.

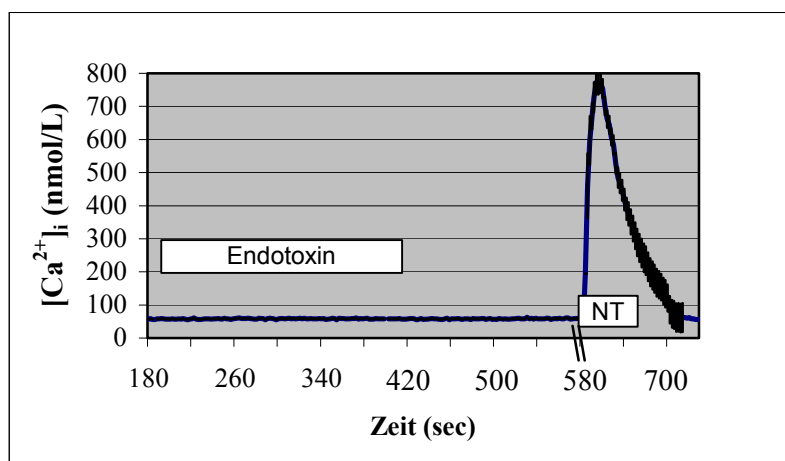


Abb. 4-13 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ während der Superfusion der Zellen mit *E. coli*-Endotoxin und Neurotensin.

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Behandlung mit 600 EU/mL *E. coli* Endotoxin (Stamm: O55:B5). MW \pm SEM von 6 Zellen (SEM an der Basislinie < 2 nmol/L). Als Kontrollstimulus wurde am Ende des Experiments Neurotensin, NT = 100 nmol/L verwendet. Die Zeitachse wurde hier aufgrund der kurzen Messintervalle variiert.

4.2.5 Charakteristische pH_i -Veränderungen induziert durch das anaerobe Medium zur *in vitro*-Fermentation und Ammoniumsulfat

Weder die biogenen Amine noch die Endotoxine konnten mit den Unterschieden zwischen FÜ und SCFA-Gemisch in Zusammenhang gebracht werden.

Weiterführende Untersuchungen wurden mit dem von der Firma Südzucker AG zur Verfügung gestellten Anaerobiermedium (AM), welches als Trägermedium zur *in vitro* Fermentation der Oligosaccharide diente, durchgeführt. Es wurde hinsichtlich seiner Effekte auf den pH_i als auch die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht.

Zum Vergleich wurde das AM mit den im FÜ analysierten SCFA-Konzentrationen versetzt und ebenfalls Messungen durchgeführt (AM + SCFA). Ein Vergleich der Änderungen des pH_i und der $[Ca^{2+}]_i$ zum FÜ ist in Abb. 4-14 dargestellt.

Die graphischen Verläufe erinnern an die sog. „Ammonium-Vorpuls“-Technik, mit der Hilfe von Ammoniumverbindungen kann das Zytoplasma azidifiziert werden (Gonda et al. 1999, Maouyo et al. 2000, Ramirez et al. 2000). Ergänzende Versuche schlossen sich daher mit Ammoniumsulfat $[(NH_4)_2SO_4; 10 \text{ mmol/L}]$, entsprechend der Ausgangskonzentration im AM, an.

Allen dargestellten Graphen gemeinsam ist die charakteristische pH -Wert-Änderung und die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Letztere variiert ja nach Versuchssubstanz in der Dauer der Erhöhung. Die Abb. 4-14 zeigt, dass der schnelle Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch den FÜ auch bei Behandlung mit $(NH_4)_2SO_4$ auftritt. Parallelen sind weiterhin sichtbar

zwischen dem SCFA-versetzten AM und dem FÜ, die beide nahezu identische graphische Verläufe nach Ende der Superfusion zeigen. Die maximalen Ratiowerte bei der Alkalisierung des pH_i und die Ratiowerte der abfallenden Plateauphase während der Superfusion der Lösungen unterscheiden sich voneinander. Das AM alleine führt zu einer stärker ausgeprägten Alkalisierung, der pH_i fiel während der Plateauphase bereits steil ab. Das mit SCFA versetzte AM hingegen führte zu einer weniger ausgeprägten Alkalisierung, die Plateauphase verlief flacher. Nach Wegnahme der Stimuli erfolgte beim AM eine weitaus stärkere Azidifizierung, als bei den Versuchen mit AM + SCFA. Die Änderung der Ratiowerte von BCECF, die durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 mmol/L) induziert werden, ist annähernd identisch mit den Änderungen der Ratio-Werte des AM alleine (s. Abb. 4-14). Laut Information der Firma Südzucker liegt die in den FÜ verbleibende NH_4^+ -Konzentration unter 0,05 mg/L. Die Stimulation der HT-29-Zellen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, der Konzentration von 0,05 mg/L zeigte jedoch keine Effekte auf den pH_i bzw. die $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

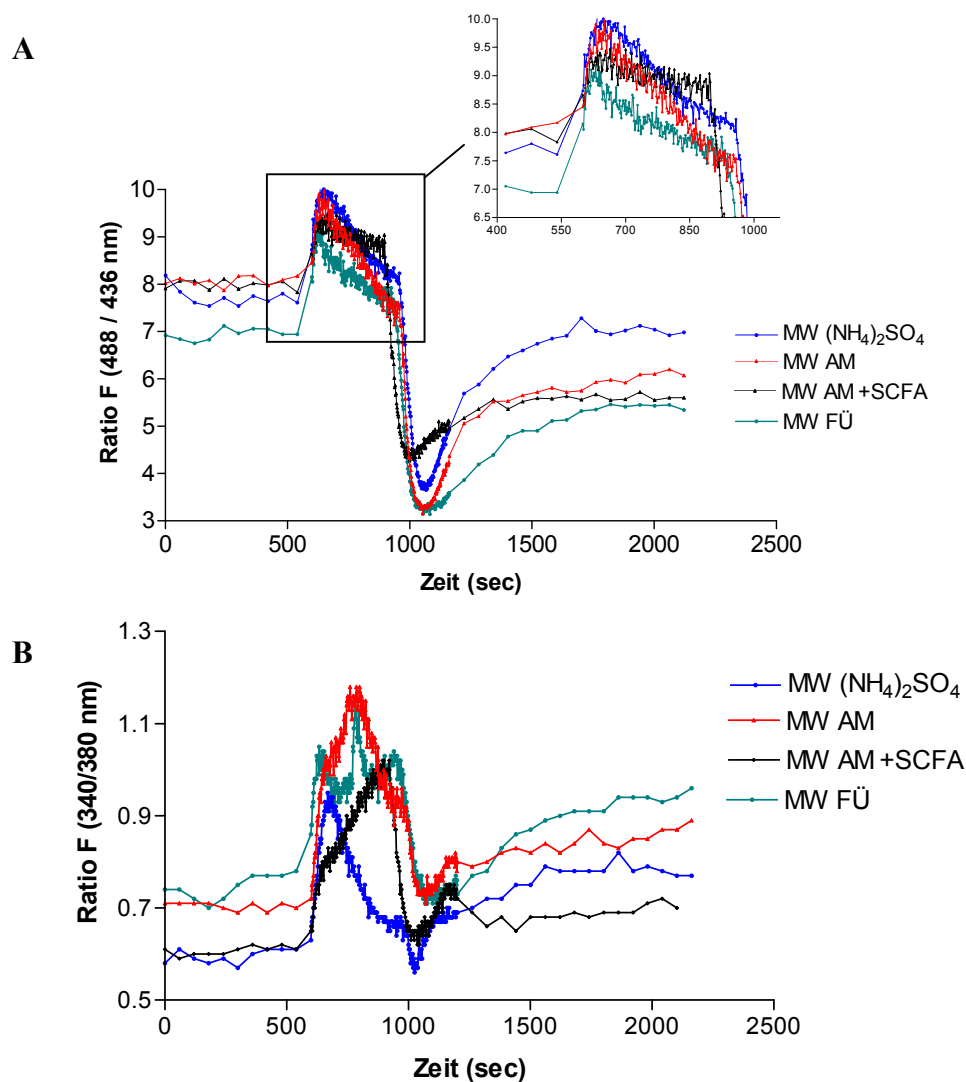


Abb. 4-14 Graphischer Vergleich der Ratiowerte des pH_i (A) und der $[Ca^{2+}]_i$ (B) nach Behandlung mit dem FÜ, dem Anaerobiermedium (AM), dem mit SCFA-versetztem AM bzw. $(NH_4)_2SO_4$ (10 mmol/L). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 6-7 Zellen eines repräsentativen Versuches, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der SEM verzichtet.

4.3 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Butyrat

Neben Veränderungen des pH_i und einer erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ zählen auch die MAP-Kinase-Kaskaden zu den bedeutenden intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion, sie stehen in Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose und der Genexpressionskontrolle. Proliferationshemmende bzw. Apoptose-induzierende Mechanismen sind bei Hemmung der Karzinomprogression von zentraler Bedeutung. SCFA -vornehmlich Butyrat- vermögen sowohl die Proliferation in HT-29-Karzinomzellen zu hemmen, wie auch Apoptose zu induzieren (Hague et al. 1995 und

1997, Singh et al. 1997, Augenlicht et al. 2002, Ruemmele et al. 2003, Tan et al. 2002). Eine Verbindung beider Mechanismen zu den MAPK-Kaskaden wird vermutet (Davido et al. 2001, Mandal et al. 2001, Ding et al. 2001, Witt et al. 2000 und 2001, Wang et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Kinase-Kaskaden von JNK bzw. p38 bei der Vermittlung dieser Fettsäure-induzierten Prozesse beteiligt sind. Die folgenden Ergebnisse zeigen die Effekte der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf die Phosphorylierung der MAPK p38 bzw. SAPK/JNK nach Inkubationszeiten zwischen 1 und 48 h.

4.3.1 Effekte auf die SAPK/JNK-Aktivität

Bei der Behandlungszeit von 8 h konnte eine Phosphorylierung der stressaktivierten c-jun-N-terminalen Kinase 1 (JNK 1) durch Butyrat induziert werden. Bei allen anderen Behandlungszeiten kam es zu keiner Aktivitätsänderung der Proteinkinase gegenüber der Negativkontrolle. Ausschließlich durch das als Positivkontrolle eingesetzte Anisomyzin konnte eine Phosphorylierung von JNK 1 (46 kDa) und JNK 2 (54 kDa) nachgewiesen werden. Abb. 4-15 zeigt in der oberen Reihe die phosphorylierten SAPK/JNK- sowie in der unteren Reihe die Gesamt-SAPK/JNK-Banden. Nach visueller Kontrolle der Behandlungen im Lichtmikroskop konnten bereits festgestellt werden, dass sich während der langen Inkubationszeiten über 24 bzw. 48 h zahlreiche tote Zellen im Medium befanden. Diese wurden beim Spülschritt mit PBS entfernt und gingen somit nicht mit in die Analyse ein. Die schwächere Bande des Gesamt-SAPK/JNK-Proteins in der Spur der 48 h Behandlung sind hierauf zurückzuführen.

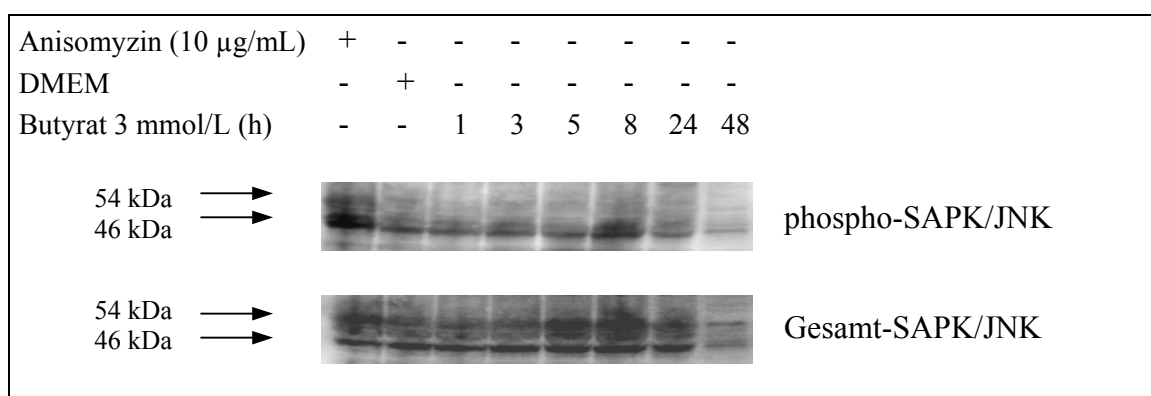


Abb. 4-15 Effekte von Butyrat (3 mmol/L) auf die Aktivität der SAPKinasen JNK 1 und 2 in HT-29-Zellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Die Inkubationszeiten betragen 1- 48 h, als Positivkontrolle wurde Anisomyzin (10 µg/mL) für 1 h inkubiert. Unbehandelte Zellen in DMEM ohne FCS dienten zur Negativkontrolle (n = 3).

4.3.2 Effekte auf die p38-Aktivität

Die Ergebnisse zeigen, dass die p38-MAP-Kinase durch die Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat nicht aktiviert werden konnte (s. repräsentative Abb. 4-16). Wie bereits unter 4.3.1 beschrieben, war die Anzahl abgestorbener Zellen nach Beenden der 48-stündigen Inkubation mit Butyrat erhöht. Sie wurden im Spülschritt nach der Behandlung entfernt und gingen nicht in die Analysen ein. Die schwächere Gesamt-p38-Proteinbande in Abb. 4-16 ist damit zu erklären.

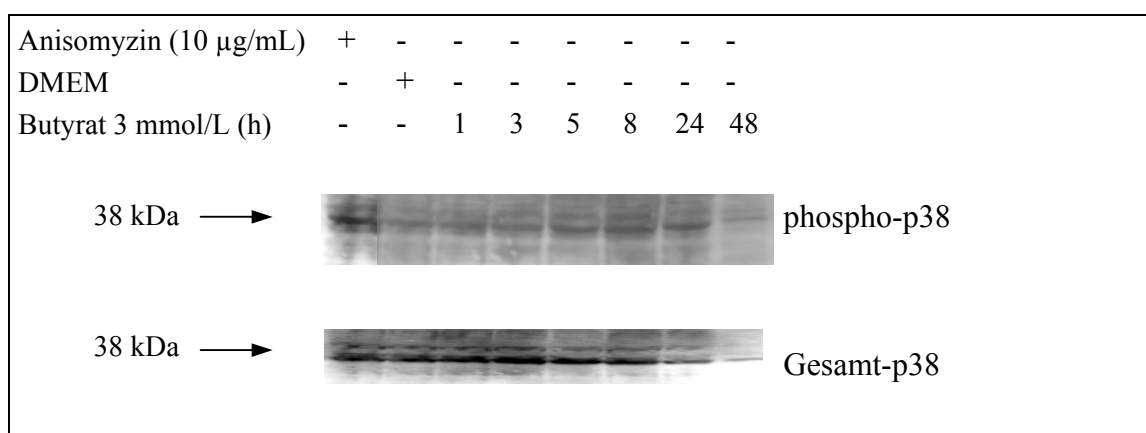


Abb. 4-16 Effekte von Butyrat (3 mmol/L) auf die Aktivität der p38-MAPK in HT-29-Zellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Die Inkubationszeiten betragen 1- 48 h, als Positivkontrolle wurde Anisomyzin (10 µg/mL) für 1 h inkubiert. Unbehandelte Zellen in DMEM ohne FCS dienten zur Negativkontrolle (n = 3).

4.4 Expressionsänderung Kolonkrebs-relevanter Gene

Aufgrund der bisher bekannten Effekte von Butyrat hinsichtlich seiner Wirkung auf die Expressionsänderung verschiedener Gene, die für Mechanismen wie die Apoptoseinduktion oder Zellzykluskontrolle in Karzinomzellen von Bedeutung sind (Hague et al. 1997, Heerdt et al. 1991 und 1997, Mandal et al. 1998, Emenaker et al. 2001a und 2001b, Lührs et al. 2002) können karzinompräventive Wirkungen postuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Butyrat (3 mmol/L) auf sieben verschiedene Gene mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht.

Es wurden die mRNA-Mengen der Transkriptionsfaktoren *c-myc*, *NF-κB* und *PCNA* sowie des pro-apoptotisch wirkende *Bax* und das anti-apoptotisch wirkenden *Bcl-2*

bestimmt. Weiterhin wurde ein eventueller Einfluss auf das durch Onkogene, Wachstumsfaktoren oder Zytokine induzierbare *Cox-2*-Gen betrachtet. Im Tumorgewebe wird vermehrt *Cox-2*-mRNA exprimiert und entfaltet daher anti-apoptotische Wirkung, seine Isoform *Cox-1* wird dagegen konstitutiv exprimiert und erfährt in Tumorgewebe keine Erhöhung der RNA-Menge. Zur Normalisierung unterschiedlicher Einsatzmengen der Ausgangsproben wurde die cDNA des konstitutiv exprimierten „Housekeeping“-Gens *GAPDH* als Bezugsgröße bei jeder Versuchsreihe mit amplifiziert.

4.4.1 Amplifikation der Transkriptionsfaktoren *c-myc* und *NF-κB*

Die Untersuchungen der Expressionhöhe von *c-myc*-RNA ergaben von der Inkubationszeit abhängige Effekte. Die *c-myc*-mRNA-Menge nahm durch Inkubation mit Butyrat zeitabhängig bis zu einer Inkubationszeit von 3 h stetig ab. Bei den nachfolgenden Inkubationszeiten von 6, 12, und 16 h setzte sich der Effekt nicht mehr streng zeitabhängig fort (s. Abb. 4-17 A). Die Effekte waren nicht statistisch signifikant. Die mRNA von *NF-κB* zeigte trotz der Behandlung mit Butyrat zwischen 1- 24 h im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung in der Menge. *TNF-α*-vermittelt konnte ein signifikanter Anstieg ($p \leq 0,01$) des *NF-κB*-Amplifikats im Vergleich zur DMEM-Kontrolle gezeigt werden. (s. Abb. 4-17 B). Alle weiteren Behandlungen unterschieden sich kaum von der Kontrolle mit DMEM.

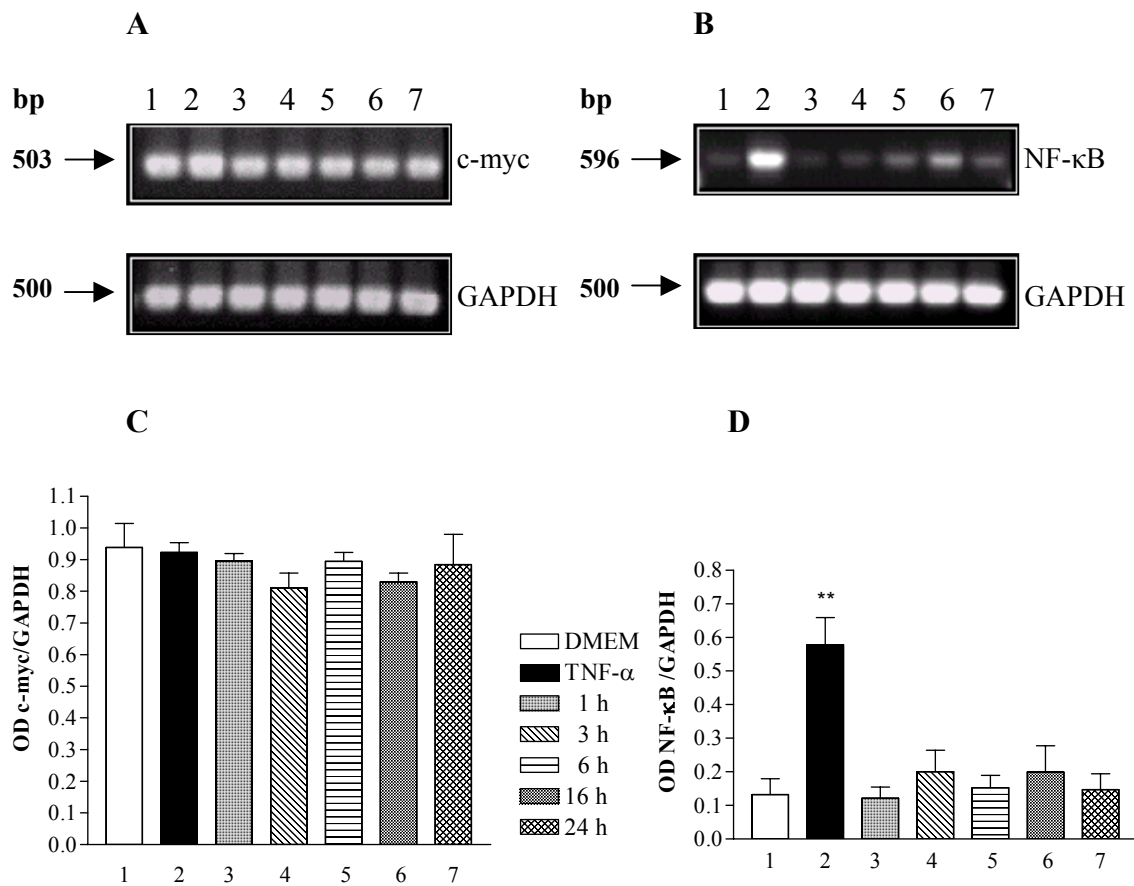


Abb. 4-17 Expressionsänderungen bei den Transkriptionsfaktoren *c-myc* (A) und *NF-κB* (B) in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert und die cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und die Amplifikate mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid.

Die Abbildungen A und B zeigen jeweils in den oberen Reihen die Amplifikate von *c-myc* bzw. *NF-κB*, die unteren Reihen zeigen die zugehörigen PCR-Banden für *GAPDH*. DMEM diente als Negativ-, *TNF-α* (30 ng/ml) als Positivkontrolle. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus einem 1,2 % Agarose-DNA-Gel (gefärbt mit Ethidiumbromid) aus $n = 4$. Für *c-myc* (C) konnten keine signifikanten Änderungen zur Kontrolle ermittelt werden, die mRNA-Menge von *NF-κB* (D) wurde durch *TNF-α* signifikant reduziert (** = $p \leq 0,01$).

4.4.2 Amplifikation des Transkriptionsfaktors *PCNA*

Die Fluoreszenzintensität der PCR-Produkt-Banden in Abb. 4-18 A zeigt die Effekte von Butyrat auf die exprimierte mRNA-Menge des Transkriptionsfaktors *PCNA*. Bei einer Inkubationszeit von 16 bzw. 24 h mit Butyrat (3 mmol/L) war die Intensität der Amplifikat-Banden für *PCNA* im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Im Fall der 24-stündigen Inkubation der HT-29-Zellen war die Reduktion der exprimierten mRNA-Menge signifikant ($p \leq 0,05$).

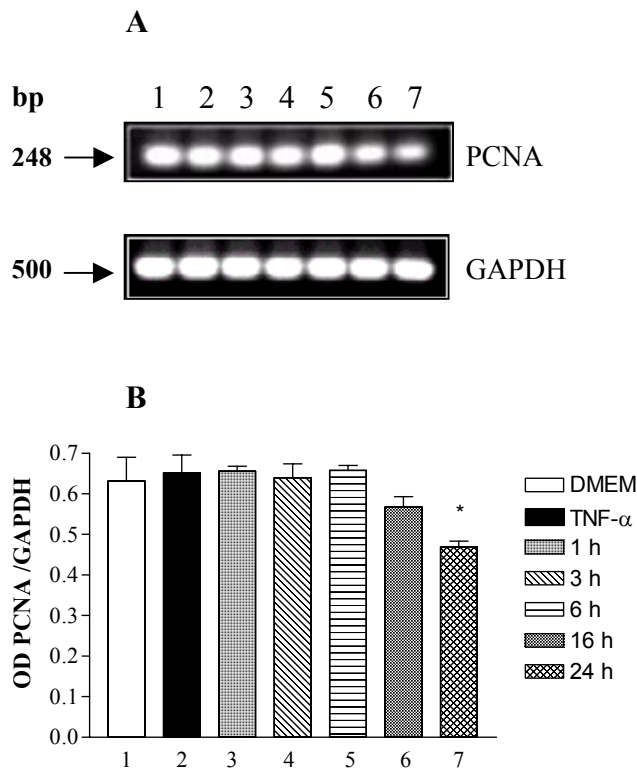


Abb. 4-18

Expressionsänderungen bei PCNA (A) in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert, die cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und die Amplifikate mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid

Die Abbildung A zeigt in der oberen Reihe die Amplifikate von PCNA die unteren Reihen zeigen jeweils die zugehörigen PCR-Banden für GAPDH. DMEM diente als Negativkontrolle, TNF- α (30 ng/mL) als Positivkontrolle. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus einem 1,2 % Agarose-DNA-Gel (gefärbt mit Ethidiumbromid) aus $n = 4$.

Abbildung B: Die mRNA-Menge für PCNA wird durch eine 24-stündige Behandlung mit Butyrat signifikant reduziert (Signifikanzniveau 24 h: * = $p \leq 0,05$).

4.4.3 Amplifikation von Cox-1 und Cox-2

In Abb. 4-19 (A und B) sind die Auswirkungen einer Butyratinkubation (3 mmol/L) auf die mRNA-Spiegel von *Cox-1*- bzw. *Cox-2* dargestellt. Die Amplifikation zeigte keine signifikant veränderte Expression durch die Behandlung. Die Menge an Cox-2-mRNA konnte durch eine TNF- α -Behandlung signifikant erhöht werden ($p \leq 0,01$). Die Quotienten der optischen Dichte von Cox-2-Banden zu GAPDH-Banden stiegen zwar mit zunehmender Inkubationsdauer von Butyrat leicht an - größte Effekte waren bei einer Inkubation von 24 h zu beobachten - jedoch blieben alle detektierten Veränderungen der mRNA-Menge ohne statistische Signifikanz.

Auch die Änderungen der *Cox-1*-Expression waren nicht statistisch signifikant. Die mRNA-Menge konnte sowohl TNF- α -vermittelt, als auch nach einer 1-stündigen Butyratinkubation leicht reduziert werden. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahmen die Intensitäten der Cox-1-Banden zwar leicht zu, signifikante Veränderungen konnten jedoch nicht ermittelt werden.

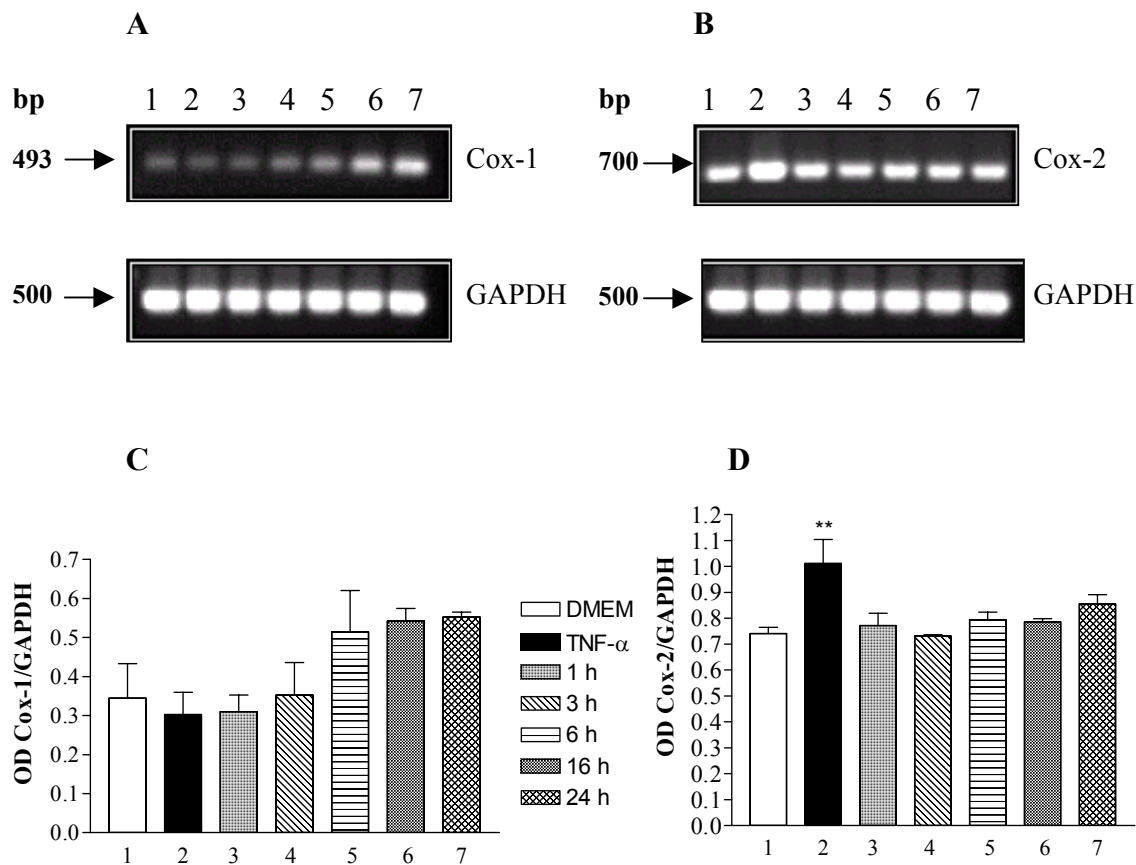


Abb. 4-19 Expressionsänderungen bei Cox-1 (A) und Cox-2 (B) in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert, die cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und die Amplifikate mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid

Die Abbildungen A und B zeigen jeweils in den oberen Reihen die Amplifikate von Cox-1 bzw. Cox-2, die unteren Reihen zeigen jeweils die zugehörigen PCR-Banden für GAPDH. DMEM diente als Negativkontrolle, TNF- α (30 ng/mL) als Positivkontrolle. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus einem 1,2 % Agarose-DNA-Gel (gefärbt mit Ethidiumbromid) aus $n = 4$. Die statistische Auswertung ergab für Cox-1 (C) keine signifikanten Änderungen zur DMEM-Kontrolle, die Menge an Cox-2-mRNA (D) wurde durch Behandlung mit TNF- α signifikant erhöht (** = $p \leq 0,01$). Alle anderen Behandlungen zeigten keine signifikanten Effekte von Butyrat auf die Cox-2-Expression in HT-29-Zellen.

4.4.4 Amplifikation von pro-apoptotisch wirkendem Bax

Nach Auswertung der optischen Dichten von Bax in Bezug auf GAPDH konnte nach der Behandlung mit Butyrat für 1 h sowie mit TNF- α (30 ng/mL) eine deutliche Steigerung der Bax-Expression nachgewiesen werden. Bei den nachfolgenden Inkubationszeiten von 3, 6 bzw. 16 h wurden schwächere normalisierte Bax-Amplifikat-Banden-Intensitäten detektiert, als nach der 1-stündigen Behandlungszeit (s. Abb. 4-20 A). Nach 6-stündiger Inkubation wurde der mRNA-Spiegel von Bax gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert, nach 24 h Butyrat-Inkubation hingegen war die

Amplifikation der transkribierten mRNA-Menge vergleichbar mit den Mengen der 1-stündigen Behandlung. Ähnlich uneinheitliche, von der Inkubationszeit abhängige Effekte auf die mRNA-Menge konnten bereits für c-myc bzw. NF- κ B gezeigt werden (s. Abb. 4-17 A, B). Die statistische Auswertung führte zu keinen signifikanten Unterschieden bei der Bax-Expression.

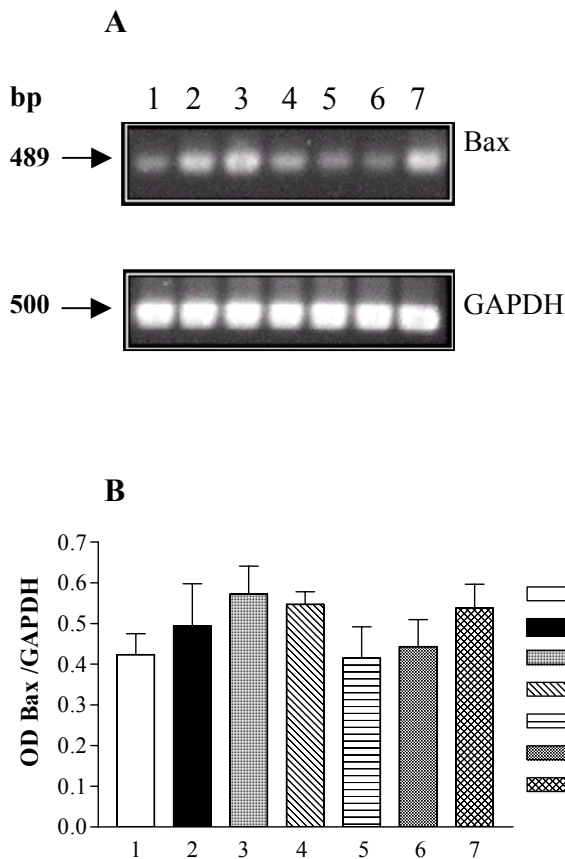


Abb. 4-20

Expressionsänderungen beim pro-apoptischen Bax (A) in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert, die cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und die Amplifikate mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid

Die Abb. A zeigt in der oberen Reihe die Amplifikate von Bax, die untere Reihe stellt die jeweils zugehörigen PCR-Banden für GAPDH dar. DMEM diente als Negativkontrolle, TNF- α (30 ng/mL) als Positivkontrolle. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus einem 1,2 % Agarose-DNA-Gel (gefärbt mit Ethidiumbromid) ($n = 4$).

Abb. B: Für Bax konnten im Vergleich zur DMEM-Kontrolle keine signifikanten Änderungen der mRNA-Spiegel nach Butyratbehandlung (3 mmol/L) gezeigt werden.

4.4.5 Amplifikation des anti-apoptischen *Bcl-2*

Nach der Färbung des DNA-Gels mit Ethidiumbromid konnten in den Spuren, die *Bcl-2*-cDNA enthielten, keine Banden detektiert werden. Die amplifizierte GAPDH-Transkripte waren hingegen im Gel nachweisbar (s. Abb. 4-21). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass *Bcl-2* in HT-29-Karzinomzellen nicht exprimiert wird (Violette et al. 2002, Gamet-Payraastre et al. 2000).

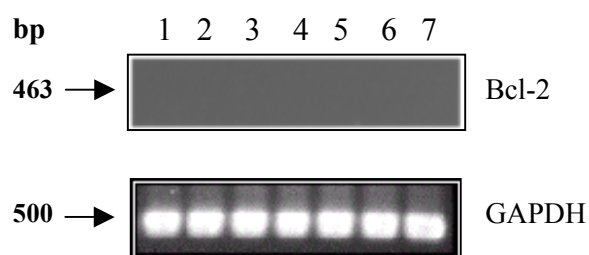


Abb. 4-21 Expressionsänderungen beim anti-apoptischen Bcl-2 in HT-29-Zellen nach Behandlung mit 3 mmol/L Butyrat. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert, die cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und die Amplifikate mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid.

Die Abb. zeigt in der unteren Reihe die PCR-Banden für GAPDH. DMEM diente als Negativkontrolle, TNF- α (30 ng/mL) als Positivkontrolle. Im Gel konnten keine Bcl-2 Amplifikate nachgewiesen werden. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus einem 1,2 % Agarose-DNA-Gel (gefärbt mit Ethidiumbromid) ($n = 3$).

5 Diskussion

Die Erforschung der Zusammenhänge zwischen pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ermöglicht die nähere Charakterisierung der frühen Signaltransduktion bei der Karzinogenese. Gerade im Hinblick auf die steigenden Inzidenzen des kolorektalen Karzinoms in den westlichen Industriestaaten sind weiterführende Untersuchungen nahrungsinduzierter Effekte auf Karzinomzellen hinsichtlich präventiver Wirkungen und ihrer Mechanismen bei der Kolonkarzinogenese von großer Bedeutung.

Für fermentierbare, funktionelle Kohlenhydrate und die daraus entstehenden SCFA wird eine Reihe von karzinompräventiven Wirkungen auf das Kolonepithel postuliert (s. Abb. 2-1). Die derzeitige Forschung konzentriert sich auf die molekularen Mechanismen, über die eine mögliche Karzinomprävention moduliert werden könnte.

Erkenntnisse mit Fermentationsgemischen, welche die *in vivo*-Situation imitieren, konnten bisher in Zellkultur nicht gewonnen werden. Die meisten publizierten Ergebnisse basieren auf reinen Einzelfettsäuren (Azetat, Propionat, Butyrat). Auch SCFA-Gemische, wie sie natürlicherweise im Kolon vorkommen, waren weniger häufig Gegenstand der Experimente (Wang und Friedmann 2000, Marchetti et al. 1997).

In dieser Arbeit wurden erstmals Fermentationsgemische (FÜ) aus *in vitro*-Versuchen und äquimolare SCFA-Gemische an HT-29-Zellen hinsichtlich ihrer Effekte auf verschiedene Abschnitte der Signaltransduktion untersucht. Im Mittelpunkt stand die Frage, welche Effekte die FÜ und SCFA-Gemische auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 ausüben und über welche Mechanismen diese vermittelt werden. Direkte Zusammenhänge beider Parameter konnten anhand der entwickelten kombinierten Fluoreszenzmessmethode betrachtet werden. Die Beteiligung der MAP-Kinase-Kaskaden SAPK/JNK und p38 an der Vermittlung von Butyrat-induzierten Effekten wurde mittels SDS-PAGE und Western Blotting untersucht. Änderungen der RNA-Menge von Genen, die während der Karzinogenese an der Regulation der Proliferation, der Apoptose und des Zellzyklus beteiligt sind, wurden mittels RT-PCR und Gelelektrophorese bestimmt.

- Die FÜ zeigten charakteristische Effekte auf den pH_i (starke Alkalisierung, gefolgt von einer ebenso schnellen und effektiven Azidifizierung des Zytoplasmas). An die Alkalisierung war dabei eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gebunden. Durch Einsatz von EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) konnte die pH_i -Regulation bei einem aziden pH_i gehemmt werden, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung zeigte sich als EIPA-unabhängig. Die Signaltransduktion über Ca^{2+} -

Ionen wird während der Alkalisierung des pH_i durch den Einstrom extrazellulär vorliegender Ca^{2+} -Ionen vermittelt. Ca^{2+} -freie Lösungen unterbinden diesen Einstrom.

- Die Effekte der SCFA-Gemische divergieren deutlich von denen der FÜ. Die Regulation des pH_i nach SCFA-induzierter Azidifizierung kann durch EIPA vollständig gehemmt werden. Die zeitlich gebundenen Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bleiben davon unbeeinflusst. Das Ausspülen der SCFA-Lösungen führt zu charakteristischen „overshoots“ des pH_i bzw. der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Der „overshoot“ der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ findet bei der Verwendung Ca^{2+} -freier Lösungen nicht mehr statt.
- In den FÜ vorhandene biogene Amine und Endotoxine zeigten keine Effekte auf die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Das Anaerobiermedium (AM) und Ammoniumsulfat imitierten hingegen die Effekte der FÜ auf den pH_i bzw. die $[\text{Ca}^{2+}]_i$.
- Die MAPK-Kaskade von p38 konnte durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat (3 mmol/L) nicht aktiviert werden. Bei der SAPK/JNK konnte eine Phosphorylierung nach 8-stündiger Behandlung gezeigt werden.
- Die exprimierte mRNA-Menge des Transkriptionsfaktors PCNA wurde nach 24-stündiger Behandlung mit Butyrat (3 mmol/L) signifikant reduziert. Alle anderen transkribierten Amplifikate erfuhren keine Expressionsänderung.

5.1 Kombinierte Messmethode zur Bestimmung des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$

In dieser Arbeit wurde zunächst eine fluoreszenzmikroskopische Methode zur simultanen Bestimmung des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit den Farbstoffen BCECF bzw. Fura-2 etabliert. Über die simultane Bestimmung beider Parameter erhält man von einer Zelle Informationen zum Verlauf des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im direkten zeitlichen Zusammenhang. Bisher beschäftigten sich nur wenige Publikationen mit der Kombination beider Methoden (Hasselblatt et al. 2000, Zorec et al. 1993). Im Fall der SCFA bzw. der FÜ, die auch als komplexe SCFA-haltige Gemische verstanden werden können, sind die Zusammenhänge beide Parameter von besonderer Bedeutung, da im Darm absorbierte und metabolisierte SCFA zu einer Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration beitragen und die Effekte des aziden pH_i Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorrufen kann.

5.1.1 Methodenetablierung

Anhand von Einzelmessmethoden konnten zunächst sowohl für den pH_i als auch für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden. Beide Methoden wurden zusammengeführt, und mit einem speziellen Filterset für beide Farbstoffe die Kombinationsmessung ausgearbeitet. Dabei zu einer Vergrößerung des Bereiches in dem die Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 durch die des BCECF überlagert wurden. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Zorec et al. (1993), die bei einer äquivalenten Beladungskonzentration beider Farbstoffe eine zwei- bis dreifach höhere Emission von BCECF messen konnten. Bereits beim Fokussieren der Präparate unter dem Mikroskop war die erhöhte Intensität gegenüber den Einzelversuchen deutlich erkennbar. Dieser Effekt beeinträchtigte die Emission von Fura-2, was sich in niedrigeren Basalwerten der Ratio äußerte. Während der Superfusion der Zellen mit Messpuffer führte dies zu einem leichten Abfall der Ratiowerte, was auf ein Photobleaching schließen ließ. Durch mehrere Veränderungen methodischer Parameter konnte dies behoben werden.

Zum einen konnte in Anlehnung an Zorec et al. (1993) aufgrund der Erhöhung der Fura-2-Konzentration in der Markierungslösung von 5 μL auf 10 μL und der Erniedrigung der BCECF-Konzentration von 5 μL auf 2,5 μL eine deutliche Steigerung der Fura-2-Emission erzielt werden. Zum zweiten führte die Änderung der zweiten Exzitationswellenlänge für BCECF von 438 auf 436 nm zu einer Stabilisierung der Ratiowerte für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Zum dritten wurde die Belichtungszeit für jede Wellenlänge von 50 auf 30 ms reduziert und die Messintervalle von 2 auf 3 sec. erhöht, um unnötige Belichtungen und damit das Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern. Alle methodischen Veränderungen führten letztlich zu Ratioverläufen von Fura-2 bzw. BCECF, die vergleichbar mit den Einzelmessungen waren. Aufgrund der vierfachen Belichtung empfahl es sich, die Gesamtexperimentdauer von einer Stunde (inkl. Kalibrierung des pH_i -Wertes) nicht weit zu überschreiten.

Zur Zellkultivierung sei angemerkt, dass die Zellteilungsrate der in Silikonrahmen ausgesäten Zellen in der Mitte des Begrenzungsrahmens am geringsten war. Für die fluoreszenzoptischen Versuche war diese Beobachtung in sofern von Bedeutung, da bei den weniger dicht gewachsenen Zellinseln in der Mitte des Deckgläschens ein Fokussieren leichter möglich war. In den Randgebieten wuchsen die Zellen oftmals in verschiedenen Ebenen, was ein Scharfstellen der Präparate zur Mikroskopie nahezu unmöglich machte. Diese Tatsache begründet auch, wieso keine konfluenten Monolayer gemessen wurden, sondern die Zellen in subkonfluentem Zustand verwendet wurden.

5.1.2 Kalibrierungen

Wie bereits in Kap. 3.4.5 beschrieben, werden die Kalibrierungen des Fluoreszenzsystems für die Messungen durchgeführt, um einzelnen Ca^{2+} -Konzentrationen bzw. pH_i -Werten entsprechende Fluoreszenzwerte zuzuordnen. Manche Arbeitsgruppen beschränken sich bei der Darstellung ihrer Ergebnisse jedoch lediglich auf die Angabe der Ratiowerte (Fischer et al. 1996). Die Ratiowerte für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und den pH_i bewegen sich bei einem gut laufenden Messsystem innerhalb enger Grenzen, d.h. die Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen sind sehr gering, was hier als vorteilig gilt. Durch die Kalibrierung werden die Werte zwar in genaue pH-Werte umgerechnet, jedoch können diese von Experiment zu Experiment stark variieren, da die Absolutwerte von der Exaktheit der Kalibrierungswerte und der daraus ermittelten Regressionsgeraden abhängen. Da nach jedem Versuch eine Kalibrierung mit Nigerizin an den gemessenen Zellen selbst durchgeführt wird, um pH-Werte angeben zu können (Thomas et al. 1979) können die Varianzen unter Umständen recht groß sein. Dies kann der Fall sein, wenn die verwendeten Nigerizinlösungen nicht lange genug auf die Zellen einwirkten und die Angleichung zwischen intra- und extrazellulärem pH nicht vollständig abgeschlossen war. Werden die Ratiowerte zu früh gemessen, führt das zu fehlerbehafteten Regressionsgeraden.

Die Umrechnung der Fura-2-Ratiowerte zur Angabe von Ca^{2+} -Konzentrationen mittels *in vitro*-Kalibrierung ist aufwendig, da die Berechnungsformel von einer Reihe von Parametern abhängt (siehe 3.4.5.2; Grynkiewicz et al. 1985). Oftmals werden daher in der Literatur angegebene K_d - und S_T -Werte für die Berechnungen der eigenen Versuche übernommen, ohne die Werte für die eigenen Geräte zu bestimmen (Leipziger et al. 1991). Grynkiewicz et al. (1985) gaben den K_d -Wert von Fura-2 mit 224 nmol/L an, während er bei dieser Arbeit zwischen 180 und 205 nmol/L variierte. Aufgrund der Berechnungsformel ergeben sich schnell bedeutende Unterschiede bei der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, auch wenn man ähnliche Ratiowerte voraussetzen würde, da der K_d -Wert als Multiplikator mit in die Formel einfließt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Fura-2 erfolgte in dieser Arbeit indirekt über die doppeltlogarithmische Darstellung der Kalibrierung mit käuflich erwerblichen Lösungen verschiedener Kalziumkonzentrationen (s. Abb. 3-7). Nach nötigen Veränderungen am Mikroskop oder der Lichtquelle, z.B. einem Wechsel der Xenon-Lampe des Monochromators, sollten die gerätespezifischen Konstanten jeweils neu bestimmt werden, um verlässliche Berechnungswerte angeben und Artefakte ausschließen zu können. Ein Vorteil der Ergebnisdarstellung ohne eine Kalibrierung ist, dass die Präsentation von Ratioangaben

weitaus geringere Standardabweichungen und Standardfehler zwischen den Versuchen ermöglicht. Neben der Angabe von Ratiowerten bei der Ergebnisdarstellung erweist sich häufig auch die Angabe von Δ -Werten als ein gutes Darstellungsmittel zum Vergleich von Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration oder des pH-Wertes (DeSoignie und Sellin 1994, King et al. 1994, Benning et al. 1996, Nitschke et al. 1996 und 1997, Ricken et al. 1998, Hasselblatt et al. 2000). Schwankungen in den Ratiowerten zwischen einzelnen Versuchsreihen können so kompensiert werden. Es wurde in dieser Arbeit beim Vergleich einzelner Experimentserien angewandt.

5.1.3 Vergleich der basalen Werte von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit der Literatur

Die Betrachtung der basalen Werte für den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der unstimulierten HT-29-Zellen aus allen hier dargestellten Experimenten der SCFA und FÜ liefert erste Vergleichsmöglichkeiten mit den Daten anderer Autoren. Sie betragen in den eigenen Versuchen $7,32 \pm 0,02$ für den pH_i , 121 ± 4 nmol/L für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in normalem Messpuffer und 102 ± 10 nmol/L in Ca^{2+} -freiem, EGTA-haltigem Meßpuffer ($n = 6$; $\text{MW} \pm \text{SEM}$).

Publikationen der Arbeitsgruppe um Nitschke geben für HT-29-Zellen eine basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 39 ± 2 nmol/L ($n = 136$) und einen Ausgangs- pH_i von $7,28 \pm 0,03$ an ($n = 41$; Benning et al. 1996, Nitschke et al. 1997). Die Abweichung in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu den eigenen Versuchen könnte auf die Verwendung der alternativen Kalibriermethode für Fura-2 (*in vivo*-Kalibrierung mit Ionomycin) zurückzuführen sein. Bei anderen Autoren liegen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwischen 69 ± 8 und 110 ± 7 nmol/L (Leipziger et al. 1994, Fischer et al. 1996, Bleich et al. 1996). Köttgen et al. (1994) ermitteln pH_i -Ausgangswerte, die sich in ähnlichen Dimensionen bewegen ($7,21 \pm 0,07$; $n = 22$). Für die Subklon-Zelllinie von HT-29 (HT-29-Klon 19A) geben Busche et al. (1993) einen basalen pH_i von $7,23 \pm 0,04$ ($n = 20$) an. Im Vergleich zur hier angewandten Methode handelt es sich bei den angegebenen Zahlenwerten um Daten aus Einzelmessungen für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bzw. den pH_i . Die Werte können sich somit unter der Anwendung der gekoppelten Messmethode mit kombinierten Filtersets für beide Farbstoffe von den Werten der Einzelmessung unterscheiden. So ermittelten Zorec et al. (1993) bei der Messung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von bovinen laktotrophen Zellen mit der kombinierten Methode Werte von 136 nmol/L, bei den Einzelmessungen dagegen 100 nmol/L. Nach einer Studie von Abrahamse et al. (1999) beträgt die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in frisch isolierten, nicht transformierten Kolonepithelzellen der Ratte 144 ± 18 nmol/L. Die basalen pH_i -

Werte bei kultivierten Epithelzellen des Schafansens werden von Müller et al. (2000) mit $7,37 \pm 0,03$ angegeben.

Die eigenen Ergebnisse lassen sich durchaus einordnen. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die verwendeten Messpuffer und Kalibriermethoden die Ergebnisse hierbei entscheidend beeinflussen können.

5.2 Vergleichende Betrachtung der Effekte der FÜ und der SCFA-Gemische hinsichtlich pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$

5.2.1 Zusammenhang zwischen pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Bereits kleine Änderungen des pH_i können bedeutende Effekte auf die Kontrolle des Zellzyklus und die Zellproliferation, sowie auf die DNA- und Proteinsyntheseraten hervorrufen (Busa und Nuccitelli 1984; Madshus 1988). Beim Vergleich der in dieser Arbeit durchgeführten Experimentserien zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Wirkungen der SCFA-Gemische und der Fermentationsüberstände (FÜ), was auch unterschiedliche Folgen für die weitere Signaltransduktion in den HT-29-Zellen haben könnte.

Wie aus den Ergebnissen der fluoreszenzoptischen Experimente ersichtlich ist, vermögen sowohl die SCFA-Gemische als auch die weitaus komplexer zusammengesetzten SCFA-haltigen FÜ Effekte auf die frühen Signaltransduktionsmechanismen in HT-29-Zellen auszuüben. Während es bei den FÜ zunächst zu einer starken, transienten Alkalisierung des pH_i kommt, sinkt der pH_i während der Perfusion mit den SCFA-Gemischen aufgrund der Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen ab (Busche et al. 1993, DeSoignie et al. 1994, Nitschke et al. 1997, Rowe et al. 1993). Ebenso gegensätzlich verläuft die transiente Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Während diese mit der FÜ-induzierten Alkalisierung des pH_i rasch ansteigt und erhöht bleibt, bis der Stimulus ausgewaschen wird, steigt sie unter dem Einfluss der SCFA nur langsam und transient an (Kap. 4.1.1 bzw. 4.1.4). Nach dem Ausspülen der SCFA kommt es zu einem peakförmigen „overshoot“ der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der begleitet wird von einem pH_i -„overshoot“.

Kurzfristige Änderungen des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ können sich gegenseitig stark beeinflussen. Während die intrazelluläre Alkalisierung durch verschiedene Puffersysteme eine IP_3 -vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verursacht (Benning et al. 1996,

Nitschke et al. 1996), kommt es aufgrund von Azidifizierungen des pH_i nur zu sehr geringen und langsamen Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Nitschke et al. 1997).

In früheren Versuchen konnten die Autoren bereits einen Zusammenhang zwischen dem Abfall des pH_i und einem langsamen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Perfusion mit der Einzelfettsäure Azetat (20 mmol/L) in voneinander unabhängigen Messungen beider Parameter zeigen. Die schnelle intrazelluläre Azidifizierung ($\Delta\text{pH}_i = -0,31 \pm 0,03$) ist hier zurückzuführen auf die Diffusion der protonierten Fettsäure durch die Zellmembran, die im Zytosol dissoziiert und zu einem Abfall des pH_i führt. Vergleichbare Werte konnten in dieser Arbeit bei der Perfusion der Zellen mit dem SCFA-Gemisch (1:2 verdünnt) gemessen werden. Die Gesamtfettsäurekonzentration des Gemisches betrug dabei 28,1 mmol/L, sie führte zur Änderung der ΔpH_i -Werte von $-0,31 \pm 0,04$ (Kap. 4.1.4). Obwohl die Differenz zwischen dem hier verwendeten SCFA-Gemisch und der Konzentration der Einzelfettsäure bei Nitschke et al. (1997) 8 mmol/L beträgt, stimmen die Messwerte nahezu überein. Messungen mit dem SCFA-Gemisch „Kontrolle“, das aus einer Kombination der drei Einzelfettsäuren in einer Endkonzentration von 7 mmol/L zusammengesetzt ist, liefern einen möglichen Ansatzpunkt für diese Beobachtung: Die Änderung des ΔpH_i bei seiner Superfusion betrug nur sehr geringe $-0,02$ pH-Einheiten. Sowohl die Ergebnisse mit dem SCFA-Gemisch „Kontrolle“ als auch die der Einzelfettsäure Azetat lassen den Schluss zu, dass der azidifizierende Effekt alleine dosisabhängig und unabhängig von der Zusammensetzung der SCFA-Gemische ist.

Kontrovers dazu konnten Butyrat und Propionat (4 mmol/L) in den Versuchen von Marchetti et al. (1997) an HT-29-Zellen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht modifizieren. Da die Fettsäuren jedoch im Apoptose-Assay die Zahl apoptotischer Zellen ansteigen ließ, wird von einer Ca^{2+} -unabhängigen Wirkung auf die Karzinomzelllinie ausgegangen. Auch Abrahamse et al. (1999) wiesen keine Effekte von Azetat, Propionat und Butyrat (alle 6,25 mmol/L) auf die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an isolierten Rattenkolonozyten nach. Im Hinblick auf die postulierten, krebspräventiven Effekte v.a. der Einzelfettsäure Butyrat müssen diese Ergebnisse differenzierter und kritischer betrachtet werden. Die Gesamtkonzentration an Fettsäuren im Kolon scheint somit also entscheidender für die Effekte auf das Epithel bzw. die Auswirkungen auf die Karzinomzellen zu sein. Somit wären auch die Synthesen von Oligosacchariden, bei deren Fermentation generell ein möglichst hoher Butyratanteil entsteht, nicht ausschließlich anzustreben, sondern, ähnlich wie bei der Fermentation von Inulin bzw. Oligofruktose, eine möglichst hohe Ausbeute der Gesamtfettsäurekonzentration entscheidend für die Wirkungsweise.

Parallelen zeigen sich auch beim Verlauf des transienten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ während der SCFA-Behandlung mit Angaben aus der Literatur. Nach dem Auswaschen der Fettsäure konnte in den eigenen Experimenten jedoch ein höherer „overshoot“ an intrazellulären Ca^{2+} -Ionen gemessen werden (100 nmol/L gegenüber $63 \pm 9 \text{ nmol/L}$) als bei Nitschke et al. (1997). Dieser Effekt des „overshoots“ scheint in direktem Zusammenhang zur Höhe des pH_i -„overshoots“ zu stehen, der nach Wegnahme der Fettsäuren auftrat. Je höher der pH_i ins alkalische Milieu stieg, desto höher war jeweils der Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma.

Eine weitere Evidenz für diesen postulierten Zusammenhang zwischen pH_i und $[Ca^{2+}]_i$ liefern die eigenen Ergebnisse in Kap. 4.1.5. Hier konnte gezeigt werden, dass die SCFA-induzierte, transiente Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ während der Perfusion unabhängig von der EIPA-Konzentration und damit von der pH_i -Regulation ist (NHE 1 wurde durch EIPA gehemmt). Der sich anschließende „overshoot“ des pH_i nach Wegnahme der SCFA war unter Einfluss von EIPA weitaus weniger ausgeprägt, was auch einen weitaus geringeren „overshoot“ der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hatte.

Als Schlußfolgerung läßt sich sagen, dass der SCFA-induzierte transiente Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter den gewählten Bedingungen unabhängig vom pH_i ist, da durch die Hemmung des NHE 1 mit EIPA ebenfalls ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten ist. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass ein alkalischer pH_i , hervorgerufen durch die Stimulation der Zellen mit den FÜ, zu einer starken transienten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt. Diese Erhöhung könnte Auswirkungen auf die Signaltransduktion haben. So werden einige Proteinkinasen (Ca^{2+} /Calmodulin-regulierte Kinasen), die in die Zellproliferation bzw. die Apoptose involviert sind, über Ca^{2+} -Ionen reguliert (Wilmanns et al. 2000). Auch die Stimulation von MAPK bzw. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kann durch Ca^{2+} -Ionen vermittelt werden (Chawla et al. 1998). Die Hintergründe der alkalisierenden Wirkung der FÜ sind in Kap. 5.3.2 ausführlicher betrachtet.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unter Einfluss von EIPA (s. Kap. 4.1.2 und 4.1.5) geben Aufschluss über die Abhängigkeit einer $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung von einer veränderten pH_i -Regulation. EIPA ist ein bekannter Blocker des NHE, der schon mehrfach zur Inhibierung der pH_i -Regulation bei verschiedenen Zelltypen eingesetzt wurde (Teleky et al. 1994, Hasselblatt et al. 2000, Müller et al. 2000).

Während der Perfusion mit dem SCFA-Gemisch wird die pH -Regulation durch Inhibierung des NHE 1 vollständig gehemmt. Der intrazelluläre pH -Wert bleibt nach der SCFA-induzierten Azidifizierung gleichbleibend azide (hier um $0,17 \pm 0,02 \Delta pH_i$ -

Einheiten). Protonen, die nach der Hydrolyse der SCFAH zu $\text{SCFA}^- + \text{H}^+$ freigesetzt werden, können nicht mehr aus dem Zytosol ausgeschleust werden. Auch Müller et al. (2000) zeigten die EIPA-induzierte Hemmung der pH_i -Recovery nach Perfusion mit der Einzelfettsäure Butyrat (20 mmol/L) an kultivierten Epithelzellen des Schafpansens. Die Autoren wiesen eine Azidifizierung von $-0,28 \pm 0,04 \Delta\text{pH}_i$ -Einheiten nach, die Rückregulation des pH_i betrug ohne Hemmstoff $0,16 \pm 0,02$ Einheiten. Mit EIPA konnte diese pH_i -Regulation um 70 % im Vergleich zur Kontrolle gehemmt werden (die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde nicht gemessen). Die Daten der eigenen *in vitro*-Versuche an Kolonkarzinomzellen decken sich damit sehr gut (Azidifizierung: $\Delta\text{pH}_i = -0,27 \pm 0,02$; Rückregulation ohne EIPA: $\Delta\text{pH}_i = 0,17 \pm 0,03$). Mit EIPA blieben die Werte während der gesamten Perfusionszeit von 6 min. um $0,17 \pm 0,02 \Delta\text{pH}_i$ -Einheiten erniedrigt. Auch hier zeigt sich, dass lediglich der Gesamtfettsäuregehalt, nicht jedoch die Fettsäure-Art bzw. die Zusammensetzung des Gemisches ausschlaggebend für die Änderung des pH_i ist.

Auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat EIPA keinen Einfluss, sie steigt stetig an, was vermuten läßt, dass die Signalweiterleitung über Ca^{2+} -Ionen während der Perfusion der HT-29-Zellen mit SCFA unabhängig vom pH_i ist. Sobald allerdings die stimulierenden SCFA entfernt werden, kommt es zu einem „overshoot“ der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der mit dem Inhibitor um fast 50 % verringert ist ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 103 \pm 17$ nmol/L ohne EIPA; $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 56 \pm 16$ nmol/L mit EIPA).

Betrachtet man die Experimentserie FÜ + EIPA (s. Kap. 4.1.2) decken sich die Daten mit denen des reinen SCFA-Gemisches in Bezug auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist wie der starke Alkalisierungsgrad des pH_i , EIPA-unabhängig. Deutliche Effekte zeigt EIPA hingegen auf die abfallende Plateauphase während der Superfusion der Zellen mit dem FÜ. Der Abfall des ΔpH_i verdoppelt sich um 50 % ($-0,31 \pm 0,02$ ohne EIPA, $-0,63 \pm 0,03$ mit EIPA). Nach Ausspülen des FÜ unter EIPA-Einfluss kommt es zu einer stärkeren Azidifizierung. Der Grund könnte darin liegen, dass die anfallenden Protonen nicht aus dem Zytoplasma ausgeschleust werden können. Die Anreicherung des Messpuffers mit Protonenpumpenblockern kann also die pH_i -Regulation teilweise inhibieren. Die signifikante Hemmung der pH_i -Rückregulation ($p \leq 0,05$) beträgt 36 % ($\Delta\text{pH}_i = 0,50 \pm 0,01$ versus $0,32 \pm 0,05$ mit EIPA), sie ist zusätzlich zeitverzögert und reversibel.

5.2.2 Mechanismus zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$

Obleich die Experimente mit den FÜ bzw. den SCFA unterschiedliche Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$ ausüben, können Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen der Ca^{2+} -Erhöhung geschlossen werden. Hierzu werden die Ergebnisse mit der Kombination aus dem Ca^{2+} -Chelator EGTA und Ca^{2+} -freien Lösungen näher betrachtet: In Ca^{2+} -freier, EGTA versetzter Lösung kann durch Agonisten wie Carbachol (100 $\mu\text{mol/L}$), Trimethylamin (20 mmol/L) bzw. Neurotensin (10 nmol/L) ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden, was auf die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern über den PLC- und IP_3 -vermittelten Weg zurückzuführen ist (Benning et al. 1996, Nitschke et al. 1997).

Kontrovers dazu verdeutlichen die eigenen Ergebnisse aus Kap. 4.1.3 und Kap. 4.1.6, dass es sich bei der Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration im Intrazellulärraum während der Perfusion mit SCFA bzw. FÜ um einen Einstrom von extrazellulär vorliegenden Ca^{2+} -Ionen handeln muss, da es in den Versuchen mit Ca^{2+} -freien Lösungen zu keinem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kommt. Bei der Perfusion der Testsubstanzen ohne Chelatoren werden Ca^{2+} -Ionen kanalvermittelt in das Zytoplasma eingeschleust und tragen dort zur Signaltransduktion bei. Durch die Komplexbildung der Ionen wird diese Signalwirkung von Ca^{2+} unterbunden.

Die signifikant absinkenden Ratiowerte für die $[Ca^{2+}]_i$ sind beim Auswaschen des FÜ vermutlich auf die starke Azidifizierung des Zytoplasmas zurückzuführen. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits für Trimethylamin an HT-29-Zellen sowie an Neuronen nach Wegnahme von Propionat aus der Perfusionslösung gezeigt werden (Benning et al. 1996, Willoughby et al. 2001). Es könnte auf einen pH_i -induzierten Mechanismus zur Ausschleusung von Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle hinweisen. Aufgrund des von H^+ -Ionen stark angesäuerten Zytoplasmas könnte es kompensatorisch zur Ausschleusung von Ca^{2+} -Ionen durch die PMCA bzw. SERCA-vermittelt zur Aufnahme zytosolisch frei vorliegender Ca^{2+} -Ionen in die intrazellulären Speicher kommen. Als weitere Möglichkeit käme ein Na^+/Ca^{2+} -Antiport in Frage.

Auch Wolff et al. (1993) beschreiben einen Export von Ca^{2+} -Ionen in HT-29-Zellen, der durch verschiedene Agonisten wie ATP oder Carbachol nach der Entleerung intrazellulärer Speicher induziert werden kann.

Die These der von extrazellulär einströmenden Ca^{2+} -Ionen zur Signalweiterleitung wird durch die SCFA-Ergebnisse (s. Kap. 4.1.6) gestützt. Auch hier kommt es zu keiner Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, solange keine extrazellulären Ca^{2+} -Ionen vorliegen. Nach dem Auswaschen des SCFA-Gemisches findet hier jedoch ein geringer „overshoot“ der

$[Ca^{2+}]_i$ um ca. 15 nmol/L statt, was an die Höhe des pH_i -„overshoot“ gebunden scheint ($\Delta pH_i = 0,10$ Einheiten). Es könnte sich hierbei um einen Fettsäure-spezifischen Reaktion der Zellen handeln, bei der bereits das Fehlen der SCFA in der Lösung eine leichte Alkalisierung des pH_i bewirkt. Da Alkalisierungen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen können, kann dies den Effekt begründen. Ein möglicher Zusammenhang kann noch dadurch gefestigt werden, indem vor Wegnahme der SCFA-Lösung zunächst noch die Mechanismen zur Protonenausschleusung aktiv sind und den pH_i zu alkalischen pH_i -Werten zurück regulieren. Aufgrund nicht vorhandener bzw. komplexierter Ca^{2+} -Ionen in der extrazellulären Lösung kann ein kanalvermittelter Einstrom bei diesem Ca^{2+} -„overshoot“ ausgeschlossen werden. Die Erhöhung ist hier auf eine Entleerung von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Speichern zurückzuführen, für die der IP_3 -Rezeptor-gekoppelte Weg in Frage kommt. Dieser Mechanismus wurde bereits von zahlreichen Autoren für diverse Agonisten wie Forskolin, Carbachol oder Amine beschrieben (Denning et al. 1994, Fischer et al. 1992, Nitschke et al. 1997). Bei extrazellulär vorliegenden Ca^{2+} -Ionen ist der Freisetzungsprozess aus intrazellulären Speichern oft biphasisch mit einem kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom über SOCs kombiniert (Nitschke et al. 1997).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SCFA-Gemische zu einem langsamen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen, während die FÜ-induzierten Anstiege sehr rasch stattfinden. Beide Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ beruhen hier - im Gegensatz zu der in der Literatur häufig dargestellten IP_3 -gekoppelten Freisetzung aus intrazellulären Speichern - auf einem Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen.

Ob und auf welche Weise die SCFA- bzw. FÜ-vermittelte Änderung des pH_i und der $[Ca^{2+}]_i$ zu weiteren Mechanismen der Signaltransduktion während der Karzinogenese oder ihrer Prävention beitragen können ist in den Kap. 5.4 und 5.5 diskutiert.

5.3 Heterogene Zusammensetzung der FÜ

5.3.1 Biogene Amine und Endotoxine

Die vorgestellten Ergebnisse zu Änderungen des pH_i und der $[Ca^{2+}]_i$ von HT-29-Zellen durch Fermentationsüberstände und äquimolare SCFA-Gemische divergieren sehr stark voneinander. Die Fermentationslösungen aus komplexen Kohlenhydraten können nicht ohne weiteres allein anhand ihrer Gehalte an kurzkettigen Fettsäuren beurteilt werden.

Vielmehr handelt es sich dabei um sehr heterogen zusammengesetzte Gemische, deren nähere Charakterisierung zum Verständnis der Divergenzen beitragen sollte.

Neben der Möglichkeit, dass das Vorhandensein biogener Amine in den FÜ für die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich sein könnte, wurde auch die Beteiligung bakterieller Endotoxine bei der Vermittlung des Ca^{2+} -Signalings in Erwägung gezogen. Das Vorhandensein beider Substanzklassen basiert auf dem Vorkommen darmeigener Mikroorganismen. Einige Autoren beschreiben einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in verschiedenen Kolonzelllinien (T84, Colony 29 und HT-29) durch Amine (Wasserman et al. 1988, Pickles et al. 1991, Benning et al. 1996). Hierzu sei vorangestellt, dass die Polyamine Cadaverin, Putrescin, Spermidin und Spermin ubiquitär in Säugerzellen vorkommen und für die Proliferation der Zellen von Bedeutung sind (Blachier et al. 1996, Löser et al. 1990, Farriol et al. 2001). In Biopsiematerial von Kolonkarzinompatienten wurden Amine vermehrt nachgewiesen, sie gelten dort als Tumormarker (Löser et al. 1990).

Neben den Polyaminen kommen auch die Endotoxine im Gastrointestinaltrakt vor. *In vitro* (LS-123-Adenokarzinomzelllinie, HIEC-Kryptenzellen) konnte den Endotoxinen bereits proliferations-steigernde Effekte nachgewiesen werden (Olaya et al. 1999, Ruemmele et al. 2002). Endotoxine stimulieren darüber hinaus in Blut- und Immunzellen die Freisetzung von Interleukin 1 und 6 sowie TNF- α (Yang et al. 1998, Chow et al. 1999). Eine stimulierende Wirkung könnte daher auch bei Kolonkarzinomzellen vermutet werden.

Entgegen der Erwartungen waren die hier detektierten Gehalte an biogenen Aminen, die aus freien Aminosäuren der Ausgangslösung gebildet wurden, verhältnismäßig gering. Sie lagen bei einigen Aminen unter der Nachweisgrenze. Lediglich für Histamin, Cadaverin, Putrescin und Tyramin konnten Peaks im HPLC-Chromatogramm identifiziert werden. Die Konzentrationen der bakteriellen Endotoxine waren hingegen so hoch, dass sie in den FÜ bei nur sehr starker Verdünnung (bis 1:5000) quantifiziert werden konnten. Aus welchem Grund die Endotoxinkonzentrationen von FÜ und FÜ „Kontrolle“ so stark voneinander abwichen ist unklar. Die zur Fermentation eingesetzten Fäzesbakterien wurden zum einen immer in gleichem Mengenverhältnis zugesetzt, zum anderen war die Ausgangslösung zur Herstellung der Fermentationsüberstände ebenfalls immer identisch. Denkbar wäre im Vergleich zum FÜ „Kontrolle“ eine erhöhte Vermehrungsrate der Mikroorganismen während der Fermentation aufgrund des Zusatzes an Oligosacchariden.

Einige Autoren konnten bereits Effekte von Aminen auf Kolonzelllinien zeigen (Wasserman et al. 1988, Pickles et al. 1991, Benning et al. 1996). In den eigenen Versuchen führte jedoch keines der Einzelamine in den eingesetzten Konzentrationen zur Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol. Zur Kontrolle wurden die Versuche durch eine Stimulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Neurotensin verifiziert. Die Wirkungen der Endotoxine wird über Toll-like-Rezeptoren und das Rezeptorprotein CD14 vermittelt (Cario et al. 2000, Melmed et al. 2003, Bocker et al. 2003), die in HT-29-Zellen exprimiert werden. Das eingesetzte E. coli-Endotoxin (Stamm O55:B5) konnte die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der HT-29-Zellen nicht modulieren. Dagegen wiesen bereits einige Autoren eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch LPS in verschiedenen Zelltypen nach (Song et al. 2002, Enomoto et al. 2001, Liu et al. 2002, Choi et al. 2002). Die FÜ-induzierten Wirkungen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ können somit auf keine der beiden Substanzgruppen zurückgeführt werden. Da die Methode zur Bestimmung des pH_i zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollkommen etabliert war, blieb die stark alkalisierende Wirkung der FÜ auf den pH_i zunächst unbekannt. Sie konnten anhand der Kombinationsmessung erst später näher charakterisiert werden.

5.3.2 Anaerobes Fermentationsmedium (AM) und Ammonium (NH_4^+)

Nachdem das von der Firma Südzucker AG verwendete anaerobe Fermentationsmedium (AM) zur Verfügung gestellt wurde und die Messungen auf den pH_i und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgt waren, konnte ein Zusammenhang zu den FÜ-Ergebnissen hergestellt werden. Da sowohl das AM alleine, als auch das AM, dem zusätzlich die ermittelten Gehalte an SCFA zugesetzt wurden, das charakteristische FÜ-Alkalisierungsmuster ergaben, wurde ersichtlich, dass eine oder mehrere Substanz(en) im AM die Effekte verursachte(n). Der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gehalt im AM wurde in die Untersuchungen mit einbezogen und es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den pH_i -Änderungen von 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Gehalt im AM), dem AM und den FÜ. $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ wurde in der sog. „Ammonium-Prepuls“-Technik häufig zum ansäuern des pH_i in verschiedenen Zellen und Geweben benutzt (Minelli et al. 2000, Ramirez et al. 1999, Hasselblatt et al. 2000, Teleky et al. 1994, Nitschke et al. 1996, Köttgen et al. 1994). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die FÜ-induzierten Effekte auf den pH_i hauptsächlich auf den Gehalt an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zurückzuführen sind. Laut Angaben der Firma Südzucker AG lagen nach der Fermentation lediglich NH_3 -Gehalte $< 0,05$ mg/L in den FÜ vor. Mit dieser Konzentration konnten jedoch keine Effekte auf den pH_i bzw.

die $[Ca^{2+}]_i$ in HT-29-Zellen nachgewiesen werden. Den dargestellten Versuchen zufolge muss die Konzentration im FÜ jedoch weitaus höher liegen, da die Effekte fast identisch mit denen des AM waren und keine andere Erklärung dafür gefunden wurde (s. Abb. 4-14).

Die Effekte der schnellen Alkalisierung mit anschließender Azidifizierung des pH_i nach Wegnahme des FÜ bzw. des Ammoniums sind wie folgt zu erklären: Zunächst kommt es zu einer schnellen Diffusion von lipophilem NH_3 in die Zelle. Dieses bindet an intrazellulär frei vorliegende Protonen. Die Bildung von NH_4^+ führt zu einer schnellen Alkalisierung des Zytosols. Die nachfolgende Plateauphase mit abfallenden Ratiowerten ist wahrscheinlich auf den Influx von weniger permeablem NH_4^+ zurückzuführen, das dann zu dissoziieren beginnt, bzw. auf die beginnende pH_i -Regulation. Nach Stimuluswegnahme kommt es zur weiteren Dissoziation von NH_4^+ in $NH_3 + H^+$, damit verbunden eine NH_3 -Diffusion nach extrazellulär. H^+ verbleibt in der Zelle und führt zur Azidifizierung des pH_i (Deitmer und Schild 2000, Benning et al. 1996).

Die Zusammenhänge zu bereits publizierten Ergebnissen mit Ammonium stützen die eigenen Vermutungen. Müller et al. (2000) konnten an Epithelzellen des Schafpansens zeigen, dass die pH_i -Regulation nach einem Vorpuls mit NH_4^+/NH_3 durch EIPA um 58 % inhibiert werden kann. In den eigenen Versuchen konnte die pH_i -Regulation nach der Perfusion mit dem NH_4^+ -haltigen FÜ + EIPA um 36 % gehemmt werden. An Kolonkryptenzellen des Menschen wiesen Teleky et al. (1994) nach Hemmung des NHE 1 durch Amilorid einen weiterbestehenden sauren pH_i nach dem Prepuls nach. Gleiche Effekte konnten mit Na^+ -freier Lösung erzielt werden, da der Antiport von Protonen auch hier nicht erfolgen kann. In Experimenten von Minelli et al. (2000) konnte an murinen Mikrogliazellen ein Zusammenhang zwischen NH_3/NH_4^+ und einer IP_3 -vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ hergestellt werden. Die Parallelen zwischen den Ergebnissen der Literatur und den eigenen Beobachtungen, lassen den Schluss zu, dass Ammonium die hauptsächliche Wirksubstanz in den FÜ darstellt.

Die Effekte von NH_3/NH_4^+ auf die Änderung des pH_i sowie die damit in Verbindung stehende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ sind nicht nur *in vitro* von Bedeutung. Die Ergebnisse mit den FÜ bringen für die Übertragbarkeit der Experimente von den HT-29-Kolonkarzinomzellen auf das humane Kolonepithel einige wichtige Erkenntnisse. In den Fäzes können aufgrund des Proteinstoffwechsels der darmeigenen Mikroorganismen ebenfalls beträchtliche Konzentrationen an NH_4^+ nachgewiesen werden, die mit der Proteinzufuhr korreliert. Alles et al. (1999) geben die tägliche Ausscheidung an Ammonium mit ca. 85 mg an. Hughes et al. (2002) messen je nach Diät variierende

NH₃-Gehalte der Fäzes (protein- bzw. ballaststoffreiche Diät). Die ausgeschiedenen Konzentrationen liegen zwischen 3,7 – 5,3 mmol/Tag, dies entspricht ca. 63 – 90 mg NH₃/Tag. Möglich wäre, dass das Ammonium im Darm, sowohl auf gesunde Epithelzellen als auch auf Karzinomzellen Wirkungen entfalten könnte. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine erhöhte Zufuhr komplexer Kohlenhydrate bzw. Ballaststoffe die Bildungsrate von NH₄⁺ im Darm zu verringern vermag (Boffa et al. 1992, Silvester et al. 1997). Da erhöhte Ammoniumspiegel als Promotor für die Tumorgenese gelten (Bartram et al. 1993, Topping und Visek 1976, Clinton et al. 1988), ist diese Kenntnis ein weiterer Ansatzpunkt der Präventionsstrategie von Ballaststoffen beim Kolonkarzinom.

5.4 Mögliche Zusammenhänge früher Signaltransduktionsmechanismen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29

Die genauere Charakterisierung von Signaltransduktionswegen, die möglicherweise durch SCFA moduliert werden können, sollte Hinweise auf die Zusammenhänge zellulärer Mechanismen während der Kolonkarzinogenese erbringen. Ein besseres Verständnis dieser Signalwege könnte dazu beitragen, die Bedeutung von unverdaulichen Kohlenhydraten und SCFA bei der Prävention von Kolonkarzinomen zu beleuchten. Vorangestellt sei, dass im Rahmen dieses Projektes weitere Untersuchungen vorgenommen wurden, die zur Erläuterung der nachfolgenden Zusammenhänge grundlegend sind. Eine Proliferationshemmung durch die FÜ sowie die SCFA-Gemische konnte dosisabhängig nachgewiesen werden (Inkubationsdauer: 5 Tage). Bei einer 1:2 Verdünnung fand kaum noch ein nachweisbares Wachstum der Zellen statt. Durch beide Lösungen konnte in einer 1:2 Verdünnung die Induktion der Apoptose (nach 24 h Inkubationszeit mittels Annexin-V-Assay und Durchflusszytometrie) nachgewiesen werden. Die Apoptoseinduktion, vermittelt nach 24 h Inkubationszeit mit einer 1:2 Verdünnung des SCFA-Gemisches (28,1 mmol/L Endkonzentration), erfolgte über eine Aktivierung von Caspase-3. Dabei war das auch in dieser Arbeit untersuchte SCFA-Gemisch weitaus wirksamer, als der FÜ. Die jeweiligen Kontrollen von FÜ und SCFA zeigten dabei die stärksten Effekte (Roser 2002, persönliche Mitteilungen). Auch die Einzelfettsäuren Azetat, Propionat und Butyrat induzierten Apoptose, die ab 30 mM Butyrat signifikant war. Eine Proliferationshemmung konnte für Butyrat nach 2 Tagen Behandlungszeit ab einer Konzentration von 5 mmol/L gezeigt werden (Lang 2001).

5.4.1 Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden

Zwei potentielle Mechanismen des protektiven Effekts von Ballaststoffen bzw. der SCFA beim Kolonkarzinom sind die Hemmung der Proliferation sowie die Apoptoseinduktion (Mandal et al. 2001; Davido et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte an HT-29-Zellen bei der Inkubationszeit von 8 Std. eine Phosphorylierung von JNK 1 nachgewiesen werden. Eine Aktivierung von JNK 1 in humanen Kolorektalkarzinomzellen (DiFi- bzw. FET-Zellen) durch Butyrat (3 mmol/L) wurde von Mandal et al. (2001) nach 3-6 h nachgewiesen. Die weitere Signaltransduktion zur Einleitung der Apoptose wird mit der Stimulation der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B in Zusammenhang gebracht (s. Kap. 5.4.2). Die Ergebnisse können weiterhin mit einer Studie von Wang und Friedmann (2000) in Zusammenhang gebracht werden. Anhand verschiedener SCFA-Mischungen (SCFA-Konzentrationen zwischen 15,5 und 60 mmol/L) konnte die Induktion der Apoptose über einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase an U4-Zellen (Zellmodell für humane intestinale Kolonozyten) nachgewiesen werden. Die Autoren zeigten eine Beteiligung der stressaktivierten Kinase JNK 1 in Verbindung mit der Proteolyse des Tumorsuppressors p53 nach der Phosphorylierung durch JNK (3 – 24 h. Butyrat- bzw. SCFA-Inkubation). Eine Beteiligung von Caspase-3 konnte nach einer Inkubation von 12 – 72 h gezeigt werden (Wang und Friedman 2000). Die Aktivierung von JNK 1 erfolgte auch in Caco-2-Kolonkarzinomzellen nach 8-stündiger Butyratbehandlung (5 mmol/L). Sie blieb bis zu einer Inkubationszeit von 72 Std. nachweisbar (Ding et al. 2001). Aufgrund der Aktivierung von JNK 1 nach 8-stündiger Inkubation in den eigenen Versuchen könnte ein solcher Signalweg in HT-29-Zellen ebenfalls denkbar sein. Allerdings konnte die Aktivierung über diese Inkubationszeit hinaus nicht mehr nachgewiesen werden. Da das in dieser Arbeit verwendete SCFA-Gemisch (28,1 mmol/L Endkonzentration) eine Caspase-3-vermittelte Apoptose nach 24 Stunden Inkubationszeit induziert (Roser 2002, persönliche Mitteilung), könnte der Weg zuvor über JNK 1 vermittelt werden. Zur genaueren Charakterisierung der Effekte wäre eine vergleichende Untersuchung von Einzelfettsäuren und Fettsäuregemischen auf die JNK-Aktivität in Verbindung mit möglichen Transkriptionsfaktoren, die durch JNK phosphoryliert werden (z.B. c-Jun, AP-1), denkbar.

Bei keiner der dargestellten Inkubationszeiten mit 3 mmol/L Butyrat konnte eine Aktivierung der p38-Kinase erzielt werden. Die mögliche Beteiligung von Butyrat am Differenzierungs- und Apoptoseprozess wird in der vorliegenden Arbeit nicht über diesen Signalweg vermittelt.

5.4.2 SCFA-induzierte Regulation der Genexpression beim Kolonkarzinom

Der Zusammenhang zwischen multiplen Signaltransduktionsmechanismen während der Karzinogenese bzw. ihrer Prävention erweist sich als sehr komplex. Die möglichen Weiterleitungswege eines Ca^{2+} -Signals über das Zusammenspiel von Kinasen mit Transkriptionsfaktoren oder nukleären Genen sind sehr vielfältig. Wie in den Kap. 2.5.2 und 2.5.3 bereits ausgeführt, können Mutationen, die Aktivierung von Protoonkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Adenomentstehung und seiner Progression beitragen. Das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose ist bei Karzinomzellen gestört (Lührs et al. 2002). Die in dieser Arbeit untersuchten Gene sind an der Zellzyklusregulation bzw. dem apoptotischen Prozess beteiligt.

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, konnte in dieser Arbeit lediglich beim Transkriptionsfaktor PCNA bei 24 h Behandlungszeit signifikante Effekte durch Butyrat auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Er ist neben den Effekten auf die Transkripte von Bax und Cox-2 nachfolgend näher betrachtet.

Der Transkriptionsfaktor PCNA, ist für die Zellzykluskontrolle von Bedeutung. Er dient als Kofaktor für die DNA-Polymerase und kontrolliert die DNA-Replikation der Zelle (Augenlicht et al. 2002, Wraba 1997). Die Verteilung von PCNA ist Zellzyklus-abhängig: In der S-Phase findet man es vornehmlich bei der DNA-Replikation, darüber hinaus ist es bei der Reparatur geschädigter bzw. veränderter DNA beteiligt. In malignen Kolonzellen sind seine Spiegel erhöht (Shpitz et al. 1997). Hier konnte gezeigt werden, dass die mRNA Spiegel von PCNA durch Butyrat (3 mmol/L) bei einer Expositionszeit von 16 bzw. 24 h signifikant erniedrigt werden konnten. Damit kann durch Butyrat eine Hemmung der Zellproliferation erreicht werden, was in HT-29-Zellen durchaus von Bedeutung für die postulierten, karzinompräventiven Wirkungen ist. Weitere Autoren berichten vergleichbare Effekte auf mRNA- bzw. Proteinebene in dieser Zelllinie. Eine Herabregulation des Transkriptionsfaktors durch Inkubation mit 2 mmol/L Butyrat nach 48 bzw. 72 h wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Menzel et al. 2002). Auch die Ergebnisse von Emenaker et al. (2001b) stützen mit ihren Ergebnissen an humanen invasiven Kolonozyten die These, dass Butyrat die Zellproliferation über eine Hemmung von PCNA zu inhibieren vermag. Eine Reduktion um ca. 21 % zur Kontrolle nach 10 mmol/L Butyrat zeigte sich in Versuchen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Die in dieser Arbeit beobachteten Wirkungen von Butyrat auf die Spiegel der PCNA-mRNA könnte durchaus von Bedeutung für Präventionsstrategien durch SCFA sein. Die These wird zudem gefestigt, da die PCNA-Herabregulation in verschiedenen Testsystemen auf mRNA- als auch auf Proteineben

nachgewiesen werden konnte. PCNA ist den Ergebnissen nach in die Butyrat-induzierte Regulation der DNA-Synthese der Karzinomzellen involviert. Seine Herabregulation durch SCFA könnte somit von Bedeutung für die Prävention durch Ballaststoffe sein.

Beim *bax*-Gen konnte nach 1, 3 und 24 h Butyrat-Inkubation (3 mmol/L) eine Tendenz zur vermehrten Transkription gezeigt werden. Keiner der Effekte auf das *bax*-Gen war jedoch statistisch signifikant. Nach 1-stündiger Inkubation waren die Effekte von Butyrat am größten, nach 6 Std. lag der mRNA-Spiegel unter dem der unbehandelten Kontrolle. Auch TNF- α -vermittelt kann ein Anstieg der Transkriptionsrate beobachtet werden. *Bax* zählt wie *p53* zu den pro-apoptotischen Genen. HT-29-Zellen haben ein funktionsunfähiges *p53*-Protein (Rodrigues et al. 1990), ihre Basalspiegel an anti-apoptotischen Proteinen (*Bcl-2* und *Bcl-X_L*) sind vermindert, während erhöhte *Bax*-Spiegel nachgewiesen wurden (Violette et al. 2002; Boddie et al. 1998). Ein Signalweg über *Bax* könnte auch für die vorliegende Arbeit postuliert werden. Das *bax*-Gen wird je nach Inkubationszeit mit Butyrat vermehrt bzw. vermindert exprimiert. Der erneute Anstieg der *bax*-Expression bei 16 bzw. 24 Std. Behandlungszeit könnte auf eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen aufgrund der langen Behandlungszeiten (vgl. MAP-Kinase-Experimente) zurückzuführen sein. Auch hier waren vermehrt aus dem Zellverband gelöste Zellen in den 6-well-Platten zu beobachten, was bei der Konzentrationsbestimmung der Gesamtmenge an RNA auffiel. Mikroskopisch konnten auch an Caco-2-Zellen bei längeren Butyratbehandlungen (> 24 Std.) vermehrt abgelöste Zellen im Medium beobachtet werden (Kamitani et al. 1998). Die Hypothese für die Beteiligung von *Bax* an der Vermittlung der Apoptose werden durch eine Studie von Mandal et al. (2001) gestützt. Sie wiesen eine erhöhte *bax*-mRNA-Menge bei 3 bzw. 6 h Behandlung in FET-Zellen (humane Kolorektalkarzinomzelllinie) nach und postulieren dass die Butyrat-induzierte Apoptose durch die erhöhte Transkription des *bax*-Gens über die Aktivierung des JNK/AP-1-Wegs vermittelt wird. Wie oben ausgeführt, konnte die MAP-Kinase JNK1 in dieser Arbeit nach 8-stündiger Inkubation mit Butyrat aktiviert und im Western Blot nachgewiesen werden. Eine Verbindung der Signalwege von *Bax* und JNK1 kann daher auch in HT-29-Zellen in Betracht gezogen werden. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ als frühes zelluläres Signal, z.B. für die Hochregulation Apoptose-relevanter Gene, könnte in diesem Modell als auslösender Effekt beteiligt sein. Ein Zusammenspiel zwischen einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aufgrund einer *Bax*-Überexpression bei der Induktion der Apoptose wurde nachgewiesen (Pan et al. 2001).

Ein weiterer interessanter Aspekt während der Bax-vermittelten Apoptose liegt in der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach Verlust des Mitochondrienmembranpotentials. Nutt et al. (2002) konnten die Bax-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER mit einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien während der Apoptose in Zusammenhang bringen.

Cox-2 wird in der Mehrzahl kolorektaler Karzinome überexprimiert (Eberhart et al. 1994), was sich u.a. in einer erhöhten PGE_2 -Synthese äußert und mit der Pathogenese des Kolonkarzinoms in Zusammenhang gebracht wird (Hasegawa et al. 2001). Eine Hemmung der Cox-2-Expression, wie sie in Caco-2-Zellen durch 5 mmol/L Butyrat mittels Northern und Western Blot zwischen 10 und 48 h Behandlungszeit beobachtet wurde (Kamitani et al. 1988), konnte hier nicht gezeigt werden. Es kam lediglich zu einer signifikanten Expressionssteigerung der Cox-2-mRNA durch $\text{TNF-}\alpha$, welches als Positivkontrolle diente. Eine Behandlung mit Cox-2-Inhibitoren, wie nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Wirkstoffen (kurz: NSAIDs), konnte das Tumorwachstum im Tiermodell, wie auch das Wachstum der Karzinomzelllinie HT-29, verringern. Die Wirkstoffe arretieren den Zellzyklus in der G_0/G_1 -Phase und inhibieren den Übergang in die S-Phase (Grösch et al. 2001; Dommels et al. 2003). Dies macht Cox-2 zum bedeutenden Ziel für chemopräventive Ansätze. In Experimenten, die Butyrat mit NSAIDs kombinierten konnte eine stärkere Apoptoserate als mit der Fettsäure alleine erzielt werden (Menzel et al. 2002; Crew et al. 2000). Die Effekte wurden hier über die Herabregulation der Proteine PCNA, p53 und Bcl-X_L (nachgewiesen über RNase Protection Assay bzw. Western Blot) vermittelt. Die Ergebnisse sprechen für eine kombinierte Therapie aus chemischem Wirkstoff und Ballaststoffen beim Kolonkarzinom bzw. seiner Prävention.

5.5 Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation: Karzinomprävention durch Ballaststoffe?

Die frühen Veränderungen des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Signaltransduktion in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 konnten anhand der FÜ und der SCFA-Gemische näher charakterisiert werden. Es konnten ferner Effekte auf Mechanismen, die im Zusammenhang mit einer Hemmung der Proliferation und einer Apoptoseinduktion stehen, aufgezeigt werden. Die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade von JNK1 und die Änderungen der mRNA-Mengen Kolonkrebs-relevanter Gene könnten für die

Wirksamkeit der SCFA, im Besonderen Butyrat, bei der Prävention des Kolonkarzinoms bedeutend sein.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation muss allerdings differenziert betrachtet werden, zusätzlich sind hier weiterführende Untersuchungen nötig. An frisch isolierten Rattenkolonozyten konnten Abrahamse et al. (1999) beispielsweise keine Effekte von Azetat, Propionat und Butyrat (alle 6,25 mmol/L) auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ messen. Die Fettsäuren Azetat und Butyrat zeigten jedoch einen protektiven Effekt auf den zytotoxischen H_2O_2 -induzierten oxidativen Stress. Entgegen der Erwartungen der Autoren konnten die Ergebnisse mit zwei äquimolar zusammengesetzten SCFA-Gemischen (Az:Prop:But: Gemisch 1= 41:21:38 nach Fermentation resistenter Stärke, Gemisch 2= 75:15:10 nach Fermentation von Pektin) nicht erzielt werden. Aus welchem Grund hier die Einzelfettsäuren wirksamer waren, als die Gemische konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise sind für die protektiven Effekte der Fettsäuren *in vivo* zusätzlich andere Faktoren ausschlaggebend beteiligt.

Die Ergebnisse mit den hier untersuchten Fermentationsüberständen, die die *in vivo*-Situation imitieren sollten, erbrachten divergierende Ergebnisse zu den untersuchten SCFA-Gemischen, deren protektive Rolle bisher postuliert wurde. Die Ergebnisse aus Versuchen mit den SCFA tragen zur Manifestation ihrer Bedeutung als schützende Substanzklasse beim Kolonkarzinom bei. Die FÜ verhalten sich jedoch dazu konträr und lassen Raum für weitere Untersuchungen. Auch im Säugerkolon liegen die SCFA in einer komplexen Matrix eingebunden vor, hier entstehen zusätzlich Amine, Endotoxine und Ammonium. Über mögliche Synergien oder gegenseitige Beeinträchtigungen der Substanzen im Darm liegen bisher *in vivo* keine Daten vor. Vor allem die Ammonium-vermittelte pH_i -Änderung und die damit in Zusammenhang stehende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ könnte für entsprechende Mechanismen der Signaltransduktion im Kolon von entscheidender Relevanz sein. Weiterführende Experimente könnten mit Fäzeswasser durchgeführt werden, um zu vergleichen, ob der starke Ammoniumeffekt, den die FÜ auf den pH_i und die $[Ca^{2+}]_i$ haben, *in vitro* bestätigt werden kann. Ob diese Effekte *in vivo* analog auftreten, bleibt offen. Möglicherweise könnten sich die Wirkungen von SCFA und anderen fermentationsbedingten Verbindungen im Kolon gegenseitig potenzieren oder miteinander interagieren. Rieger et al. (1999) führten Untersuchungen an HT-29-Klon19A-Zellen mit Fäzeswasser durch, die einen Zusammenhang zwischen einer ballaststoffreichen Diät und der Verringerung der Genotoxizität des gewonnenen Fäzeswasser erkennen ließen. Ziel weiterführender Studien, sollte daher sein, möglichst

nicht nur die Wirkung von Einzelsubstanzen zu untersuchen, sondern den *in vivo*-Gegebenheiten im Kolon *in vitro* so nahe wie möglich zu kommen, indem so viele Faktoren wie möglich berücksichtigt werden. Aussagen zur Übertragbarkeit der Effekte können nur so gewährleistet werden. Möglicherweise sind nicht, wie bisher angenommen, die SCFA alleine während der Karzinomprävention entscheidend.

In der Diskussion um den postulierten „Schutz vor Krebs“ durch funktionelle Kohlenhydrate bzw. Ballaststoffe im Allgemeinen sollten auch epidemiologische Studien berücksichtigt werden. In früheren Fall-Kontroll-Studien wurden protektive Wirkungen durch Ballaststoffe postuliert, die eine signifikante Reduktion des Risikos zur Ausbildung eines Kolorektalkarzinoms mit einer gesteigerten Ballaststoffzufuhr in Zusammenhang bringen (Howe et al. 1992). Neuere Studien, wie die amerikanischen „Nurses’ Health Study“, zeigen hingegen kein Zusammenhang zwischen der Schutzwirkung von Ballaststoffen auf die Entstehung des Kolonkarzinoms (Fuchs et al. 1999). Auch in neueren Interventionsstudien mit ballaststoffhaltigen Lebensmitteln und der Supplementierung mit Weizenkleie bei Patienten mit operativ entferntem Karzinom, konnten bisher keine protektiven Effekte bezüglich einer erneuten Adenombildung bestätigt werden (Schatzkin et al. 2000; Alberts et al. 2000). Diese Resultate zeigen, dass die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse nicht analog auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind. Die Sinnhaftigkeit und Effektivität der Anreicherung von Lebensmitteln mit zusätzlichen Ballaststoffen wie funktionellen Kohlenhydraten bzw. Präbiotika ist aus epidemiologischer Sicht daher fraglich und wird weiterhin Gegenstand zukünftiger Forschung bleiben.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamse, S.L., Pool-Zobel, B.L. and Rechkemmer, G. (1999) Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis*, **20**, 629-634.
- Alberts, D.S., Martinez, M.E., Roe, D.J., Guillen-Rodriguez, J.M., Marshall, J.R., van Leeuwen, J.B., Reid, M.E., Ritenbaugh, C., Vargas, P.A., Bhattacharyya, A.B., Earnest, D.L. and Sampliner, R.E. (2000) Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med*, **342**, 1156-1162.
- Alles, M.S., Hartemink, R., Meyboom, S., Harryvan, J.L., Van Laere, K.M., Nagengast, F.M. and Hautvast, J.G. (1999) Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. *Am J Clin Nutr*, **69**, 980-991.
- Argenzio, R.A. and Whipp, S.C. (1979) Inter-relationship of sodium, chloride, bicarbonate and acetate transport by the colon of the pig. *J Physiol*, **295**, 365-381.
- Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M., Wilson, A., Arango, D., Yang, W., Heerdt, B.G. and Velcich, A. (2002) Short Chain Fatty Acids and Colon Cancer. *J Nutr*, **132**, 3804S-3808S.
- Bartram, H.P., Scheppach, W., Schmid, H., Hofmann, A., Dusel, G., Richter, F., Richter, A. and Kasper, H. (1993) Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH. *Cancer Res*, **53**, 3283-3288.
- Benning, N., Leipziger, J., Greger, R. and Nitschke, R. (1996) Effect of alkalization of cytosolic pH by amines on intracellular Ca^{2+} activity in HT29 cells. *Pflügers Arch*, **432**, 126-133.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Lipp, P. (1998) Calcium-a life and death signal. *Nature*, **395**, 645-648.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000) Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science*, **287**, 1604-1605.

- BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“, Berlin (1999) Abschlußbericht der Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ am BgVV, Oktober 1999.
<http://www.bfr.bund.de/cms/media.php/70/probiot.pdf> (Stand 08/2003)
- Bioprotech, Inc. (2003) Produktbeschreibung.
<http://www.bioprotech.com/Products/FCS2/fcs2.html> (Stand: 03/2003)
- Blachier, F., Robert, V., Selamnia, M., Mayeur, C. and Duee, P.H. (1996) Sodium nitroprusside inhibits proliferation and putrescine synthesis in human colon carcinoma cells. *FEBS Lett*, **396**, 315-318.
- Blais, A., Aymard, P. and Lacour, B. (1997) Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflügers Arch*, **434**, 300-305.
- Bleich, M., Riedemann, N., Warth, R., Kerstan, D., Leipziger, J., Hor, M., Driessche, W.V. and Greger, R. (1996) Ca²⁺ regulated K⁺ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflügers Arch*, **432**, 1011-1022.
- Bocker, U., Yezersky, O., Feick, P., Manigold, T., Panja, A., Kalina, U., Herweck, F., Rossol, S. and Singer, M.V. (2003) Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis*, **18**, 25-32.
- Boddie, A.W., Jr., Constantinou, A., Williams, C. and Reed, A. (1998) Nitrogen mustard up-regulates Bcl-2 and GSH and increases NTP and PCr in HT-29 colon cancer cells. *Br J Cancer*, **77**, 1395-1404.
- Boffa, L.C., Lupton, J.R., Mariani, M.R., Ceppi, M., Newmark, H.L., Scalmati, A. and Lipkin, M. (1992) Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Res*, **52**, 5906-5912.
- Bookstein, C., DePaoli, A.M., Xie, Y., Niu, P., Musch, M.W., Rao, M.C. and Chang, E.B. (1994) Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest*, **93**, 106-113.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F. and Lipp, P. (2001) Calcium signalling-an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 3-10.
- Bugaut, M. (1987) Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B*, **86**, 439-472.

- Burkitt, D.P. (1971) Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, **28**, 3-13.
- Busa, W.B. and Nuccitelli, R. (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*, **246**, R409-R438.
- Busche, R., Jeromin, A., von Engelhardt, W. and Rechkemmer, G. (1993) Basolateral mechanisms of intracellular pH regulation in the colonic epithelial cell line HT29 clone 19A. *Pflügers Arch*, **425**, 219-224.
- Busche, R., Bartels, J., Genz, A.K. and von Engelhardt, W. (1997) Effect of SCFA on intracellular pH and intracellular pH regulation of guinea-pig caecal and colonic enterocytes and of HT29-19a monolayers. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, **118**, 395-398.
- Busche, R., Dittmann, J., Meyer zu Duttingdorf, H., Glockenthor, U., von Engelhardt, W. and Sallmann, H. (2002) Permeability properties of apical and basolateral membranes of the guinea pig caecal and colonic epithelia for short-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, **1565**, 55-63.
- Calvert, P.M. and Frucht, H. (2002) The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*, **137**, 603-612.
- Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.C. and Podolsky, D.K. (2000) Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*, **164**, 966-972.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Charney, A.N., Micic, L. and Egnor, R.W. (1998) Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *Am J Physiol*, **274**, G518-G524.
- Chawla, S., Hardingham, G.E., Quinn, D.R. and Bading, H. (1998) CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science*, **281**, 1505-1509.
- Chen, Y.Q., Hsieh, J.T., Yao, F., Fang, B., Pong, R.C., Cipriano, S.C. and Krepulat, F. (1999) Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene*, **18**, 2747-2754.
- Choi, H.B., Khoo, C., Ryu, J.K., van Breemen, E., Kim, S.U. and McLarnon, J.G. (2002) Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor-alpha and $[Ca^{2+}]_i$ responses in human microglia by the peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195. *J Neurochem*, **83**, 546-555.

- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J. and Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, **274**, 10689-10692.
- Clinton, S.K., Bostwick, D.G., Olson, L.M., Mangian, H.J. and Visek, W.J. (1988) Effects of ammonium acetate and sodium cholate on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced colon carcinogenesis of rats. *Cancer Res*, **48**, 3035-3039.
- Cogswell, P.C., Kashatus, D.F., Keifer, J.A., Guttridge, D.C., Reuther, J.Y., Bristow, C., Roy, S., Nicholson, D.W. and Baldwin, A.S. (2002) NF-kappa B and Ikappa B alpha are found in the mitochondria: Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem*, **278**, 2963-2968
- Crew, T.E., Elder, D.J. and Paraskeva, C. (2000) A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis*, **21**, 69-77.
- Cummings, J.H. and Englyst, H.N. (1987a) Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr*, **45**, 1243-1255.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P. and Macfarlane, G.T. (1987b) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, **28**, 1221-1227.
- Davido, D.J., Richter, F., Boxberger, F., Stahl, A., Menzel, T., Lührs, H., Löffler, S., Dusel, G., Rapp, U.R. and Scheppach, W. (2001) Butyrate and propionate downregulate ERK phosphorylation in HT-29 colon carcinoma cells prior to differentiation. *Eur J Cancer Prev*, **10**, 313-321.
- Deitmer, J.W. and Schild, D. (2000) Ca²⁺ und pH: Ionenmessungen in Zellen und Geweben. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg; Berlin.
- Denning, G.M., Clark, R.A. and Welsh, M.J. (1994) cAMP and inositol 1,4,5-trisphosphate increase Ca²⁺ in HT-29 cells by activating different Ca²⁺ influx pathways. *Am J Physiol*, **267**, C776-C783.
- DeSoignie, R. and Sellin, J.H. (1994) Propionate-initiated changes in intracellular pH in rabbit colonocytes. *Gastroenterology*, **107**, 347-356.

- Diener, M. and Scharrer, E. (1994) The effect of short-chain fatty acids on Cl⁻ and K⁺ conductance in rat colonic crypts. *Pflügers Arch*, **426**, 472-480.
- Ding, Q., Wang, Q. and Evers, B.M. (2001) Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 282-288.
- Dommels, Y.E., Haring, M.M., Keestra, N.G., Alink, G.M., Van Bladeren, P.J. and Van Ommen, B. (2003) The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE₂ synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, **24**, 385-92.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S. and DuBois, R.N. (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**, 1183-1188.
- Emenaker, N.J. and Basson, M.D. (2001 a) Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig Dis Sci*, **46**, 96-105.
- Emenaker, N.J., Calaf, G.M., Cox, D., Basson, M.D. and Qureshi, N. (2001 b) Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J Nutr*, **131**, 3041S-3046S.
- Enomoto, N., Ikejima, K., Yamashina, S., Hirose, M., Shimizu, H., Kitamura, T., Takei, Y., Sato and Thurman, R.G. (2001) Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 51S-54S.
- Farriol, M., Segovia-Silvestre, T., Castellanos, J.M., Venereo, Y. and Orta, X. (2001) Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line. *Nutrition*, **17**, 934-938.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P. and Bodmer, W.F. (2001) The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, **10**, 721-733.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., Kinzler, K.W. and et al. (1990a) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, **247**, 49-56.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990b) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
- Fearon, E.R. (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, **278**, 1043-1050.

- Fischer, H., Illek, B., Negulescu, P.A., Clauss, W. and Machen, T.E. (1992) Carbachol-activated calcium entry into HT29 cells is regulated by both membrane potential and cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1438-1442.
- Fischer, K.G., Leipziger, J., Rubini-Illes, P., Nitschke, R. and Greger, R. (1996) Attenuation of stimulated Ca^{2+} influx in colonic epithelial (HT29) cells by cAMP. *Pflügers Arch*, **432**, 735-740.
- Fodde, R. (2002) The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **38**, 867-71.
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Rosner, B., Speizer, F.E. and Willett, W.C. (1999) Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med*, **340**, 169-176.
- Gamet, L., Daviaud, D., Denis-Pouxviel, C., Remesy, C. and Murat, J.C. (1992) Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer*, **52**, 286-289.
- Gamet-Payraastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M.A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J. and Terce, F. (2000) Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res*, **60**, 1426-1433.
- Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. and Cummings, J.H. (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, **108**, 975-982.
- Glinghammar, B. and Rafter, J. (2001) Colonic luminal contents induce cyclooxygenase 2 transcription in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology*, **120**, 401-410.
- Gonda, T., Maouyo, D., Rees, S.E. and Montrose, M.H. (1999) Regulation of intracellular pH gradients by identified Na/H exchanger isoforms and a short-chain fatty acid. *Am J Physiol*, **276**, G259-G270.
- Grösch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Bräutigam, L. and Geisslinger, G. (2001) COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J*, **15**, 2742-2744.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.

- Hague, A., Elder, D.J., Hicks, D.J. and Paraskeva, C. (1995) Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int J Cancer*, **60**, 400-406.
- Hague, A., Diaz, G.D., Hicks, D.J., Krajewski, S., Reed, J.C. and Paraskeva, C. (1997) bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int J Cancer*, **72**, 898-905.
- Halm, D.R. and Frizzell, R.A. (1991) Ion transport across the large intestine. In: Schultz, S.G. (ed.) *Handbook of Physiology, Section 6 - The Gastrointestinal System, Vol. IV: Intestinal Absorption and Secretion*. American Physiological Society, Bethesda, Maryland, , pp. 257-273.
- Hardwick, J.C., van den Brink, G.R., Offerhaus, G.J., van Deventer, S.J. and Peppelenbosch, M.P. (2001) NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene*, **20**, 819-827.
- Hasegawa, K., Ichikawa, W., Fujita, T., Ohno, R., Okusa, T., Yoshinaga, K. and Sugihara, K. (2001) Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas. *Eur J Cancer*, **37**, 1469-1474.
- Hasselblatt, P., Warth, R., Schulz-Baldes, A., Greger, R. and Bleich, M. (2000) pH regulation in isolated in vitro perfused rat colonic crypts. *Pflügers Arch*, **441**, 118-124.
- Heerdt, B.G. and Augenlicht, L.H. (1991) Effects of fatty acids on expression of genes encoding subunits of cytochrome c oxidase and cytochrome c oxidase activity in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *J Biol Chem*, **266**, 19120-19126.
- Heerdt, B.G., Houston, M.A. and Augenlicht, L.H. (1994) Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, **54**, 3288-3293.
- Heerdt, B.G., Houston, M.A. and Augenlicht, L.H. (1997) Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ*, **8**, 523-532.
- Hill, M.J., Morson, B.C. and Bussey, H.J. (1978) Aetiology of adenoma--carcinoma sequence in large bowel. *Lancet*, **1**, 245-247.

- Hommes, D.W., Peppelenbosch, M.P. and Van Deventer, S.J. (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*, **52**, 144-151.
- Howe, G.R., Benito, E., Castelleto, R., Cornee, J., Esteve, J., Gallagher, R.P., Iscovich, J.M., Dengao, J., Kaaks, R., Kune, G.A. and et al. (1992) Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst*, **84**, 1887-1896.
- Hughes, R., Pollock, J.R. and Bingham, S. (2002) Effect of vegetables, tea, and soy on endogenous N-nitrosation, fecal ammonia, and fecal water genotoxicity during a high red meat diet in humans. *Nutr Cancer*, **42**, 70-77.
- Hungate, R.E., Phillips, G.D., McGregor, A., Hungate, D.P. and Buechner, H.K. (1959) Microbial fermentation in certain mammals. *Science*, **130**, 1192-1194.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, **71**, 875-886.
- IARC, (2003) International Agency for the Research on Cancer, "Globocan 2000" Database Ver. 1.0 (built 30-11-2000).
<http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>. (Stand: 03/2003).
- Inan, M.S., Rasoulpour, R.J., Yin, L., Hubbard, A.K., Rosenberg, D.W. and Giardina, C. (2000 a) The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*, **118**, 724-734.
- Inan, M.S., Tolmacheva, V., Wang, Q.S., Rosenberg, D.W. and Giardina, C. (2000 b) Transcription factor NF-kappaB participates in regulation of epithelial cell turnover in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**, G1282-G1291.
- Johnson, G.L. and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, **298**, 1911-1912.
- Kamitani, H., Geller, M. and Eling, T. (1998) Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J Biol Chem*, **273**, 21569-21577.
- Kim, Y.I. and Mason, J.B. (1996) Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: a critical review. *Nutr Rev*, **54**, 259-279.

- King, G.G., Lohrmann, W.E., Ickes, J.W., Jr and Feldman, G.M. (1994) Identification of Na⁺/H⁺ exchange on the apical side of surface colonocytes using BCECF. *Am J Physiol*, **267**, G119-G128.
- Kirschbaum, J., Luckas, B. and Beiner, W.D. (1994) Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *Journal of Chromatography A*, **661**, 193-199.
- Köttgen, M., Leipziger, J., Fischer, K.G., Nitschke, R. and Greger, R. (1994) pH regulation in HT29 colon carcinoma cells. *Pflügers Arch*, **428**, 179-185.
- Krebs, J. (1998) Calmodulin-dependent protein kinase IV: regulation of function and expression. *Biochim Biophys Acta*, **1448**, 183-189.
- Lang, H. (2001) Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf humane Kolonkarzinomzelllinien bezüglich Proliferation, Zytotoxizität und Apoptoserate. Diplomarbeit. *Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft*. Universität Hohenheim.
- Leipziger, J., Nitschke, R. and Greger, R. (1991) Transmitter-induced changes in cytosolic calcium activity in HT-29 cells. *Cell Physiol Biochem*, **1**, 273-285.
- Leipziger, J., Fischer, K.G. and Greger, R. (1994) Voltage-dependent Ca²⁺ influx in the epithelial cell line HT29: simultaneous use of intracellular Ca²⁺ measurements and nystatin perforated patch-clamp technique. *Pflügers Arch*, **426**, 427-432.
- Leipziger, J., Nitschke, R. and Greger, R. (1996) Regulation of the intracellular calcium concentration in epithelial cells. *Kidney Blood Press Res*, **19**, 148-150.
- Liu, S.H., Lai, J.L., Yang, R.S. and Lin-Shiau, S.Y. (2002) Nitric oxide is not involved in the endotoxemia-induced alterations in Ca²⁺ and ryanodine responses in mouse diaphragms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **366**, 327-34.
- Löser, C., Folsch, U.R., Paprotny, C. and Creutzfeldt, W. (1990) Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum, and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer*, **65**, 958-966.
- Lührs, H., Hock, R., Schaubert, J., Weihrauch, M., Harrer, M., Melcher, R., Scheppach, W., Bustin, M. and Menzel, T. (2002) Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*, **97**, 567-73.
- Ma, H.T., Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K. and Gill, D.L. (2000) Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science*, **287**, 1647-1651.

- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Drasar, B.S. and Cummings, J.H. (1995) Metabolic significance of the gut microflora. In: Whitehead, R. (ed.) *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 249-274.
- Madshus, I.H. (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J*, **250**, 1-8.
- Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J. and Kumar, R. (1998) Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*, **17**, 999-1007.
- Mandal, M., Olson, D.J., Sharma, T., Vadlamudi, R.K. and Kumar, R. (2001) Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology*, **120**, 71-78.
- Maouyo, D., Chu, S. and Montrose, M.H. (2000) pH heterogeneity at intracellular and extracellular plasma membrane sites in HT29-C1 cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C973-C981.
- Marchetti, M.C., Migliorati, G., Moraca, R., Riccardi, C., Nicoletti, I., Fabiani, R., Mastrandrea, V. and Morozzi, G. (1997) Possible mechanisms involved in apoptosis of colon tumor cell lines induced by deoxycholic acid, short-chain fatty acids, and their mixtures. *Nutr Cancer*, **28**, 74-80.
- Mascolo, N., Rajendran, V.M. and Binder, H.J. (1991) Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology*, **101**, 331-338.
- Matthews, R.P., Guthrie, C.R., Wailes, L.M., Zhao, X., Means, A.R. and McKnight, G.S. (1994) Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol*, **14**, 6107-6116.
- McIntyre, A., Gibson, P.R. and Young, G.P. (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, **34**, 386-391.
- McNeil, N.I., Cummings, J.H. and James, W.P. (1978) Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*, **19**, 819-822.
- Melmed, G., Thomas, L.S., Lee, N., Tesfay, S.Y., Lukasek, K., Michelsen, K.S., Zhou, Y., Hu, B., Arditi, M. and Abreu, M.T. (2003) Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol*, **170**, 1406-1415.

- Menzel, T., Schaubert, J., Kreth, F., Kudlich, T., Melcher, R., Gostner, A., Scheppach, W. and Lührs, H. (2002) Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells. *Eur J Cancer Prev*, **11**, 271-281.
- Minelli, A., Lyons, S., Nolte, C., Verkhratsky, A. and Kettenmann, H. (2000) Ammonium triggers calcium elevation in cultured mouse microglial cells by initiating Ca(2+) release from thapsigargin-sensitive intracellular stores. *Pflügers Arch*, **439**, 370-377.
- Mortensen, P.B. and Clausen, M.R. (1996) Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*, **216**, 132-148.
- Müller, F., Aschenbach, J.R. and Gabel, G. (2000) Role of Na⁺/H⁺ exchange and HCO₃⁻ transport in pHi recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. *J Comp Physiol [B]*, **170**, 337-343.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Nagengast, F.M., van den Ban, G., Ploemen, J.P., Leenen, R., Zock, P.L., Katan, M.B., Hectors, M.P., de Haan, A.F. and van Tongeren, J.H. (1993) The effect of a natural high-fibre diet on faecal and biliary bile acids, faecal pH and whole-gut transit time in man. A controlled study. *Eur J Clin Nutr*, **47**, 631-639.
- Nakao, S., Ogtata, Y., Shimizu, E., Yamazaki, M., Furuyama, S. and Sugiya, H. (2002) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, **238**, 11-8.
- Nitschke, R., Leipziger, J. and Greger, R. (1993) Agonist-induced intracellular Ca²⁺ transients in HT29 cells. *Pflügers Arch*, **423**, 519-526.
- Nitschke, R., Riedel, A., Ricken, S., Leipziger, J., Benning, N., Fischer, K.G. and Greger, R. (1996) The effect of intracellular pH on cytosolic Ca²⁺ in HT29 cells. *Pflügers Arch*, **433**, 98-108.
- Nitschke, R., Benning, N., Ricken, S., Leipziger, J., Fischer, K. and Greger, R. (1997) Effect of intracellular pH on agonist-induced [Ca²⁺]_i transients in HT29 cells. *Pflügers Arch*, **434**, 466-474.

- Noel, J. and Pouyssegur, J. (1995) Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am J Physiol*, **268**, C283-C296.
- Nutt, L.K., Chandra, J., Pataer, A., Fang, B., Roth, J.A., Swisher, S.G., O'Neil, R.G. and McConkey, D.J. (2002) Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 20301-20308.
- Olaya, J., Neopikhanov, V. and Uribe, A. (1999) Lipopolysaccharide of Escherichia coli, polyamines, and acetic acid stimulate cell proliferation in intestinal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **35**, 43-48.
- Pan, Z., Bhat, M.B., Nieminen, A.L. and Ma, J. (2001) Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 32257-32263.
- Pickles, R.J. and Cuthbert, A.W. (1991) Relation of anion secretory activity to intracellular Ca²⁺ in response to lysylbradykinin and histamine in a cultured human colonic epithelium. *Eur J Pharmacol*, **199**, 77-91.
- Pruitt, K., Pruitt, W.M., Bilter, G.K., Westwick, J.K. and Der, C.J. (2002) Raf-independent deregulation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases are critical for Ras transformation. *J Biol Chem*, **277**, 31808-17.
- Putney, J.W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, **7**, 1-12.
- Ramirez, M., Fernandez, R. and Malnic, G. (1999) Permeation of NH₃/NH₄⁺ and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflügers Arch*, **438**, 508-515.
- Ramirez, M.A., Toriano, R., Parisi, M. and Malnic, G. (2000) Control of cell pH in the T84 colon cell line. *J Membr Biol*, **177**, 149-157.
- Rechkemmer, G., Wahl, M., Kuschinsky, W. and von Engelhardt, W. (1986) pH-microclimate at the luminal surface of the intestinal mucosa of guinea pig and rat. *Pflügers Arch*, **407**, 33-40.
- Rechkemmer, G., Ronnau, K. and von Engelhardt, W. (1988 a) Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp Biochem Physiol A*, **90**, 563-568.
- Rechkemmer, G. and von Engelhardt, W. (1988 b) Concentration- and pH-dependence of short-chain fatty acid absorption in the proximal and distal colon of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Comp Biochem Physiol A*, **91**, 659-663.

- Ricken, S., Leipziger, J., Greger, R. and Nitschke, R. (1998) Simultaneous measurements of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} transients in HT29 cells. *J Biol Chem*, **273**, 34961-34969.
- Rieger, M.A., Parlesak, A., Pool-Zobel, B.L., Rechkemmer, G. and Bode, C. (1999) A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis*, **20**, 2311-2316.
- Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V. and Lane, D.P. (1990) p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7555-7559.
- Roser, S. (2002) persönliche Mitteilungen.
- Roos, A. and Boron, W.F. (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev*, **61**, 296-434.
- Rousset, M. (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, **68**, 1035-1040.
- Rowe, W.A., Blackmon, D.L. and Montrose, M.H. (1993) Propionate activates multiple ion transport mechanisms in the HT29-18-C1 human colon cell line. *Am J Physiol*, **265**, G564-G571.
- Ruemmele, F.M., Beaulieu, J.F., Dionne, S., Levy, E., Seidman, E.G., Cerf-Bensussan, N. and Lentze, M.J. (2002) Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut*, **51**, 842-848.
- Ruemmele, F.M., Schwartz, S., Seidman, E.G., Dionne, S., Levy, E. and Lentze, M.J. (2003) Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*, **52**, 94-100.
- Ruppin, H., Bar-Meir, S., Soergel, K.H., Wood, C.M. and Schmitt, M.G., Jr. (1980) Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*, **78**, 1500-1507.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santella, L. and Carafoli, E. (1997) Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J*, **11**, 1091-1109.

- Savkovic, S.D., Koutsouris, A. and Hecht, G. (1997) Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic Escherichia coli. *Am J Physiol*, **273**, C1160-C1167.
- Schatzkin, A., Lanza, E., Corle, D., Lance, P., Iber, F., Caan, B., Shike, M., Weissfeld, J., Burt, R., Cooper, M.R., Kikendall, J.W. and Cahill, J. (2000) Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med*, **342**, 1149-1155.
- Scheppach, W. (1994) Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, **35**, S35-S38.
- Scheppach, W., Bartram, H.P. and Richter, F. (1995) Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **31A**, 1077-1080.
- Scheppach, W., Luehrs, H. and Menzel, T. (2001) Beneficial health effects of low-digestible carbohydrate consumption. *Br J Nutr*, **85 Suppl 1**, S23-S30.
- Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K. and Kronke, M. (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell*, **71**, 765-776.
- Shpitz, B., Bomstein, Y., Mekori, Y., Cohen, R., Kaufman, Z., Grankin, M. and Bernheim, J. (1997) Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am J Surg*, **174**, 425-430.
- Singh, B., Halestrap, A.P. and Paraskeva, C. (1997) Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis*, **18**, 1265-1270.
- Silver, R.B. (1998) Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular calcium and pH in living tissue. *Methods Cell Biol*, **56**, 237-251.
- Silvester, K.R., Bingham, S.A., Pollock, J.R., Cummings, J.H. and O'Neill, I.K. (1997) Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel. *Nutr Cancer*, **29**, 13-23.
- Song, P.I., Park, Y.M., Abraham, T., Harten, B., Zivony, A., Neparidze, N., Armstrong, C.A. and Ansel, J.C. (2002) Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol*, **119**, 424-432.

- Stein, J., Zores, M. and Schröder, O. (2000) Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism. *Eur J Nutr*, **39**, 121-125.
- Su, L.K., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1993) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, **262**, 1734-1737.
- Tan, S., Seow, T.K., Liang, R.C., Koh, S., Lee, C.P., Chung, M.C. and Hooi, S.C. (2002) Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer*, **98**, 523-531.
- Tanoue, T. and Nishida, E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, **15**, 455-462.
- Tarnawski, A.S. and Szabo, I. (2001) Apoptosis - programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium: survival signal from the matrix. *Gastroenterology*, **120**, 294-299.
- Teleky, B., Hamilton, G., Cosentini, E., Bischof, G., Riegler, M., Koperna, T., Feil, W., Schiessel, R. and Wenzl, E. (1994) Intracellular pH regulation of human colonic crypt cells. *Pflügers Arch*, **426**, 267-275.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2466-2470.
- Thomas, J.A., Buchsbaum, R.N., Zimniak, A. and Racker, E. (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*, **18**, 2210-2218.
- Topping, D.C. and Visek, W.J. (1976) Nitrogen intake and tumorigenesis in rats injected with 1,2-dimethylhydrazine. *J Nutr*, **106**, 1583-1590.
- Tsujii, M. and DuBois, R.N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, **83**, 493-501.
- Turner, J.T., James-Kracke, M.R. and Camden, J.M. (1990) Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **253**, 1049-1056.

- Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A.M., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Staedel, C. and Lesuffleur, T. (2002) Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X_L in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer*, **98**, 498-504.
- von Engelhardt, W., Luciano, L., Reale, E., Gros, G. and Rechkemmer, G. (1989) Transport of SCFA across the large intestinal epithelium of guinea pig. *Acta Vet Scand Suppl*, **86**, 103-106.
- von Engelhardt, W., Gros, G., Burmester, M., Hansen, K., Becker, G. and Rechkemmer, G. (1994) Functional role of bicarbonate in propionate transport across guinea-pig isolated caecum and proximal colon. *J Physiol*, **477**, 365-371.
- von Engelhardt, W. (1995) Absorption of short-chain fatty acids from the large intestine. In: Cummings, J.H., Rombeau, J.L. and Sakata, T. (eds.), *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*. Cambridge University Press, Cambridge, 149-170.
- Wang, J. and Friedman, E. (2000) Downregulation of p53 by sustained JNK activation during apoptosis. *Mol Carcinog*, **29**, 179-188.
- Wasserman, S.I., Barrett, K.E., Huott, P.A., Beuerlein, G., Kagnoff, M.F. and Dharmasathaphorn, K. (1988) Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. *Am J Physiol*, **254**, C53-C62.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (2000) A central control for cell growth. *Nature*, **403**, 255-256.
- Willoughby, D., Thomas, R. and Schwiening, C. (2001) The effects of intracellular pH changes on resting cytosolic calcium in voltage-clamped snail neurones. *J Physiol*, **530**, 405-416.
- Wilmanns, M., Gautel, M. and Mayans, O. (2000) Activation of calcium/calmodulin regulated kinases. *Cell Mol Biol*, **46**, 883-894.
- Witt, O., Sand, K. and Pekrun, A. (2000) Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood*, **95**, 2391-2396.
- Witt, O., Schulze, S., Kanbach, K., Roth, C. and Pekrun, A. (2001) Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress. *Cancer Lett*, **171**, 173-182.
- Wolff, T., Leipziger, J., Fischer, K.G., Klar, B., Nitschke, R. and Greger, R. (1993) Evidence for agonist-induced export of intracellular Ca²⁺ in epithelial cells. *Pflügers Arch*, **424**, 423-430.

- Wolin, M.J. (1981) Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science*, **213**, 1463-1468.
- Wraba, F. (1997) Suppressorgene und Onkogene: Grundlagen der Tumorgenese. Facultas-Universitätsverlag, Wien.
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L. and Godowski, P.J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, **395**, 284-288.
- Zorec, R., Hoyland, J. and Mason, W.T. (1993) Simultaneous measurements of cytosolic pH and calcium interactions in bovine lactotrophs using optical probes and four-wavelength quantitative video microscopy. *Pflügers Arch*, **423**, 41-50.

7 Abkürzungsverzeichnis

[Ion] _i / [Ion] _{ex}	intra-/extrazelluläre Ionenkonzentration
Abb.	Abbildung
AFAP	Anti-fluoresceine-alkaline-phosphate
AK	Antikörper
AM	Anaerobiermedium
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli-Gen
ATP	Adenosintriphosphat
BA	biogenes Amin
BCECF	2',7'-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluoreszein
bp	Basenpaare
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM-K	Calmodulin-Ca ²⁺ -Kinase
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Cox-1, Cox-2	Cyclooxygenase-1, -2
CREB	cAMP response element -Bindungsprotein
DAG	Diacylglycerol
DCC-Gen	<i>engl.</i> deleted in colon carcinoma-Gen
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylen glykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EIPA	Ethyl-Isopropyl-Amilorid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Endotoxin-Einheiten
F	Fluoreszenzintensität
Fa.	Firma
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis

FCS	Fötale Kälberserum
FMOC-Cl	9-Fluorenylmethyl-chloroformiat
FÜ	Fermentationsüberstand
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GTC	Guanidin-Thiocyanat
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
Ig	Immunglobulin
IP ₃ / IP ₃ R	Inositol-1,4,5-Triphosphat / -Rezeptor
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinasen
Kap.	Kapitel
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo Dalton
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Längenstandard
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert
NF-κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
NSAID	<i>engl.</i> non-steroidal anti-inflammatory drug
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>engl.</i> proliferating cell nuclear antigen
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH _i / pH _{ex}	intrazellulärer / extrazellulärer pH-Wert
PIP ₂	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Ratio
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (<i>engl.</i> short chain fatty acids)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
S _f	Gerätekonstante
SOC	<i>engl.</i> store-operated Ca ²⁺ -channel
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8 Anhang

A Lösungen

A.1 Zusammensetzung des anaeroben Phosphatpuffers zur *in vitro*-Fermentation von Oligosacchariden

Trypton	1,5 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,06 g
Hefeextrakt	1,0 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mg
KH ₂ PO ₄	0,24 g	Resazurin	1 mg
Na ₂ HPO ₄	0,24 g	Cystein/HCl	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,24 g	Vitaminlösung (nach DSM 141*)	0,5 mL
NaCl	0,48 g	Spurenelementlösung (nach DSM 141*)	9,0 mL
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,10 g	NaHCO ₃	2,0 g

→ auf 1000 mL mit aq. dest. auffüllen, pH-Wert 7,0 einstellen.

* DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig); Angaben aus Medium 141

A.2 Zusammensetzung der Ringer Lösung

Ionale Zusammensetzung der Lösung:

1	NaCl	2,4 mol/L	Na ⁺	145,0 mmol/L	
2	NaHCO ₃	0,5 mol/L	K ⁺	5,0 mmol/L	
3	{	KH ₂ PO ₄	66,6 mmol/L	Cl ⁻	124,8 mmol/L
		K ₂ HPO ₄	16,6 mmol/L	Ca ²⁺	1,2 mmol/L
4	{	CaCl ₂	24,0 mmol/L	Mg ²⁺	1,2 mmol/L
		MgCl ₂	24,0 mmol/L	HCO ₃ ⁻	25,0 mmol/L
5	Glukose	0,5 mol/L	PO ₄ ³⁻	4,2 mmol/L	

→ je 50 mL der Lösungen 1 - 4 werden in 1 L aqua bidest. gelöst und 10 mL Glukoselösung (Lagerung bei -20 °C) zugegeben.

A.3 Zusammensetzung des pH_i -Kalibrierpuffers

K-Glukonat	102,0	mmol/L
KCl	28,0	mmol/L
NaCl	10,0	mmol/L
MgCl₂	1,0	mmol/L
CaCl₂	10,0	mmol/L
Hepes	5,0	mmol/L
D-Glucose	10,0	mmol/L
Mannitol	20,0	mmol/L

→ Einstellung der pH-Werte 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 und 8.0 mit NaOH

A.4 Lösungen für die SDS-PAGE und das Western Blotting

- ❖ **SDS-Laufpuffer**
 - 100 mM Tris-Base
 - 200 mM Glycin
 - 0,1 % (w/v) SDS
 - auf pH 8,3 einstellen; Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- ❖ **SDS-PAGE-Ladepuffer**
 - 125 mM Tris-HCl
 - 4 % (w/v) SDS
 - 20 % (v/v) Glycerin
 - 100 mM DTT
 - 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
 - auf pH 6,8 einstellen; Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- ❖ **Transferpuffer**
 - 25 mM Tris-Base
 - 133 mM Glyzin
 - 20 % (v/v) Methanol
 - auf pH 8,5 einstellen

C Messwerte der Versuchsreihen

Alle Messwerte sind angegeben als MW \pm SEM.

zu 4.1.1: Ergebnisse zur Perfusion des FÜ (1:2 verdünnt in Ringer-Lösung)

<i>n</i> =3	A	B	C	D	E
pH _i	7,11 \pm 0,06	7,56 \pm 0,05	7,25 \pm 0,04	6,32 \pm 0,06	6,82 \pm 0,07
[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	86 \pm 12	200 \pm 4	172 \pm 26	97 \pm 23	140 \pm 14

zu 4.1.2: Ergebnisse zur Perfusion des FÜ (1:2 verdünnt in Ringer-Lösung) + EIPA (10 μ mol/L)

<i>n</i> =4	A	B	C	D	E
pH _i	7,40 \pm 0,05	7,43 \pm 0,06	7,87 \pm 0,08	7,25 \pm 0,10	6,27 \pm 0,04
[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	120 \pm 4	120 \pm 2	202 \pm 13	151 \pm 21	95 \pm 15

	F	G
pH _i	6,58 \pm 0,06	6,92 \pm 0,09
[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	97 \pm 21	119 \pm 19

zu 4.1.3: Ergebnisse zur Perfusion des FÜ (1:2 verdünnt in Ca²⁺-freier Ringer-Lösung) + EGTA (2 mmol/L)

<i>n</i> =3	A	B	C	D	E
pH _i	7,27 \pm 0,02	7,23 \pm 0,03	7,45 \pm 0,03	7,13 \pm 0,03	6,58 \pm 0,03
[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	121 \pm 20	96 \pm 10	105 \pm 14	-	79 \pm 10

	F	G
pH _i	7,06 \pm 0,07	7,21 \pm 0,06
[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	96 \pm 13	198 \pm 37

zu 4.1.4: Ergebnisse zur Perfusion des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt in Ringer-Lösung)

<i>n</i> =7	A	B	C	D	E
pH _i	7,40 \pm 0,08	7,09 \pm 0,06	7,26 \pm 0,08	7,53 \pm 0,10	7,20 \pm 0,08
[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	133 \pm 12	105 \pm 8	141 \pm 9	244 \pm 20	174 \pm 5

zu 4.1.4: Ergebnisse zur Perfusion des SCFA-Gemisches "Kontrolle" (1:2 verdünnt in Ringer-Lösung)

$n=5$	A	B	C	D	E
pH_i	7,26 ± 0,08	7,24 ± 0,09	7,20 ± 0,14	7,09 ± 0,14	7,11 ± 0,11
[Ca²⁺]_i (nmol/L)	122 ± 8	130 ± 8	135 ± 14	128 ± 15	147 ± 20

zu 4.1.5: Ergebnisse zur Perfusion des SCFA-Gemisches (1:2 verdünnt in Ringer-Lösung) + EIPA (10 µmol/L)

$n=6$	A	B	C	D	E
pH_i	7,44 ± 0,04	7,45 ± 0,05	7,28 ± 0,05	-	7,48 ± 0,07
[Ca²⁺]_i (nmol/L)	111 ± 4	112 ± 4	95 ± 3	121 ± 10	177 ± 26

	F	G
pH_i	7,36 ± 0,06	7,28 ± 0,04
[Ca²⁺]_i (nmol/L)	156 ± 19	129 ± 16

zu 4.1.6: Ergebnisse zur Perfusion des SCFA-Gemisches (angesetzt und 1:2 verdünnt in Ca²⁺-freier Ringer-Lösung) + EGTA (2 mmol/L)

$n=5$	A	B	C	D	E
pH_i	7,32 ± 0,04	7,13 ± 0,04	6,97 ± 0,04	7,18 ± 0,05	7,28 ± 0,05
[Ca²⁺]_i (nmol/L)	138 ± 5	111 ± 11	101 ± 12	-	115 ± 14

	F	G
pH_i	7,02 ± 0,03	7,14 ± 0,05
[Ca²⁺]_i (nmol/L)	105 ± 16	170 ± 8

zu 4.1.1: Δ-Werte von pH_i und [Ca²⁺]_i nach Behandlung mit FÜ bzw. mit FÜ-"Kontrolle" (n=3)

ΔpH_i	Δ A-B	Δ B-C	Δ C-D	Δ D-E
FÜ "Kontrolle"	0,50 ± 0,04	-0,45 ± 0,07	-0,95 ± 0,10	0,56 ± 0,02
FÜ	0,45 ± 0,05	-0,31 ± 0,02	-0,93 ± 0,07	0,50 ± 0,01

Δ[Ca²⁺]_i (nmol/L)	Δ A-B	Δ B-C	Δ C-D	Δ D-E
FÜ "Kontrolle"	463 ± 129	-339 ± 115	-116 ± 58	74 ± 19
FÜ	113 ± 9	-28 ± 27	-75 ± 24	43 ± 20

zu 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3: $\Delta p\text{H}_i$ nach Behandlung mit FÜ alleine, FÜ + EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) bzw. FÜ + EGTA (2 mmol/L)

$\Delta p\text{H}_i$	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$
FÜ	$0,45 \pm 0,05$	$-0,31 \pm 0,02$	$-0,93 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,01$

$\Delta p\text{H}_i$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$	$\Delta \text{E-F}$
FÜ + EIPA	$0,44 \pm 0,05$	$-0,63 \pm 0,03$	$-0,98 \pm 0,11$	$0,32 \pm 0,05$

$\Delta p\text{H}_i$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$	$\Delta \text{E-F}$
FÜ Ca^{2+} -frei + EGTA	$0,22 \pm 0,003$	$-0,32 \pm 0,02$	$-0,55 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,03$

zu 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6: $\Delta p\text{H}_i$ und $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Behandlung mit SCFA-Gemisch, SCFA+ EIPA (10 $\mu\text{mol/L}$) bzw. SCFA + EGTA (2 mmol/L)

$\Delta p\text{H}_i$	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$
SCFA	$-0,27 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	$-0,33 \pm 0,06$

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$
SCFA	-28 ± 7	36 ± 10	103 ± 17	-70 ± 22

$\Delta p\text{H}_i$	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-E}$	$\Delta \text{E-F}$	$\Delta \text{F-G}$
SCFA + EIPA	$0,01 \pm 0,01$	$-0,17 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$-0,11 \pm 0,02$	$-0,09 \pm 0,02$

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$	$\Delta \text{E-F}$	$\Delta \text{F-G}$
SCFA + EIPA	2 ± 2	-18 ± 1	26 ± 8	56 ± 16	-21 ± 11	-26 ± 9

$\Delta p\text{H}_i$	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-D}$	$\Delta \text{D-E}$	$\Delta \text{E-F}$	$\Delta \text{F-G}$
SCFA Ca^{2+} -frei + EGTA	$-0,18 \pm 0,05$	$-0,17 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$	$-0,27 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,02$

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)	$\Delta \text{A-B}$	$\Delta \text{B-C}$	$\Delta \text{C-E}$	$\Delta \text{E-F}$	$\Delta \text{F-G}$
SCFA Ca^{2+} -frei + EGTA	-27 ± 9	-10 ± 4	14 ± 3	-10 ± 3	49 ± 7

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojektes „Molekulare und funktionelle Analytik von Kohlenhydratbestandteilen mit gesundheitsrelevanten Funktionen“ (Fördernummer: 0311827A/B/C) am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe erstellt.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. G. Rechkemmer (BFE Karlsruhe, inzwischen Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, TU München) für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas sowie die Betreuung der Arbeit an der BFE.

Herrn Prof. Dr. R. Paulsen, AG für Zell- und Neurobiologie (Zoologie I) der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH), für die freundliche Übernahme der Fakultätsbetreuung.

Der Südzucker AG, Zentralabteilung Forschung, Entwicklung und Services (ZAFES) in Obrigheim, für die Projektkooperation. Besonderer Dank gilt den Herren Dr. Klingenberg, Dr. Martin, Dr. Vogel und Dr. Theis für die Herstellung und Analytik der Fermentationsüberstände sowie die Projektkoordination und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Jochen Kirschbaum vom Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Lebensmittelwissenschaften der Universität Gießen, für die freundliche Bereitstellung der HPLC-Anlage und der Hilfe zur Durchführung der HPLC-Analytik.

Am Institut für Ernährungsphysiologie der BFE möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Stephan Barth bedanken, der die Einführung in die Methodik übernahm und mit viel Hilfsbereitschaft und kritischen Ratschlägen maßgeblich am Entstehen dieser Arbeit beteiligt war.

Hervorzuheben sind auch meine lieben Kolleginnen und Kollegen Silvia Roser, Doris Haase, Jana Schubert, Marina Giorgi-Kotterba, Renate Lambertz, Jens Fleschhut und Frank Kratzer. Danke für das freundschaftliche Verhältnis, die Unterstützung bei der Versuchsplanung und der Zellkultur, den regen Gedankenaustausch sowie die lustigen Seiten des Laboralltags.

Meinen Freunden Stefan Storcksdieck (ETH Zürich) und Heike tom Dieck (TU München) ein dickes Dankeschön für das Korrekturlesen der Arbeit.

Abschließend möchte ich herzlichst meiner lieben Familie und meinen Freunden für die unentwegte Unterstützung und Aufmunterung während der gesamten Doktorandenzeit danken!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Rebscher
Geburt: 20.08.1974 in Groß-Umstadt (Hessen)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1980 - 1985 Grundschule Breuberg
1985 - 1989 Julius Echter Gymnasium, Elsenfeld
1989 - 1994 Gymnasium Michelstadt, Allgem. Hochschulreife

Studium

1994 - 1999 Justus Liebig Universität Gießen
Studium der Ökotrophologie, Fachrichtung Ernährungswissenschaft
- Diplomarbeit: „Quantitative Bestimmung von biogenen Aminen in fermentierten Lebensmitteln mittels HPLC nach Derivatisierung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid“ (02/99, Note 1.0)
- Diplomabschluss „Dipl. oec. troph.“ (10/99, Gesamtnote 1.5)
- Zusatzprüfung Produktions- und Qualitätsmanagement (12/99)

Berufliche Laufbahn und Promotion

seit 01/2000 Durchführung der Promotionsarbeit
2000 – 2002 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE), Karlsruhe
ab 10/2003 Angestellte als Chemikerin bei der Bachem AG, Bubendorf, Schweiz