



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Antioxidative Wirkungen von Tocopherolen auf
kolorektalen Tumorzellen“

Verfasserin

Andrea Majer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 442

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Anthropologie

Betreuerin / Betreuer:

Ao.Univ-Prof. Dr. Brigitte Marian

Die Diplomarbeit wurde am
Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien
unter der Betreuung von
A. o. Univ.-Prof. Dr. Brigitte Marian
durchgeführt.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Micksche für die Durchführung meiner Diplomarbeit am Institut für Krebsforschung.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Brigitte Marian, welche in ihrer außerordentlichen Betreuung stets für einen da war, Geduld und Zuversicht walten lies. Sie hat mich sowohl auf fachlicher als auch persönlicher Ebene sehr bereichert und ich möchte ihr für ihre mir zur Verfügung gestellte kompetente fachliche Qualität, Freundlichkeit, Zeit und Mühe sehr danken.

Ich danke desweiteren Frau Dr. Irene Herbacek für die nette Einführung und Erklärung des FACS und ihre Auswertungen.

Einen großen Dank möchte ich auch meinen lieben Laborkollegen für ihre Mithilfe und die vielen lustigen und interessanten Stunden mit ihnen aussprechen.

Meiner Mutter, meinem Bruder, meinen Freunden und meinem Hund möchte ich auch ganz besonders danken. Ich danke Ihnen für ihre Unterstützung, Ehrlichkeit und Liebe während meiner Studienzeit und in allen weiteren Lebenslagen.

Zusammenfassung

Lipidhydroperoxide (LOOH) entstehen beim Erhitzen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren unter Sauerstoff. Diese Peroxide sind in der Lage weitere Lipidperoxidationsreaktionen in Zellmembranen der Darmepithelzellen hervorzurufen und oxidativen Stress durch die Bildung freier Radikale zu verursachen.

Unter diesen Aspekten wurden die nicht-enzymatischen Schutzmechanismen der α - und γ -Tocopherole auf LOOH-Einwirkung in der Karzinomzelllinie HT29 und den Adenomzelllinien LT97-2 und LT97-3 untersucht. Mittels Dichlorofluorescein-FACS konnte durch LOOH-Behandlung eine Erhöhung der H_2O_2 -Bildung bei HT29 und LT97-2 und eine Schutzfunktion der beiden Tocopherole gegenüber weiterer Radikalbildung in der Karzinomzelllinie nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte die durch Hämatin-Eisen erhöhte H_2O_2 -Bildung durch α -Tocopherol-Behandlung in HT29 und LT97-3 gehemmt werden.

An dieser Schutzwirkung haben nicht nur die chemischen Eigenschaften der Tocopherole sondern auch ihre Auswirkungen auf die zellulären Schutzenzyme Katalase und Superoxiddismutase sowie auf die Expression von entzündungs-assoziierten Genen Anteil. α -Tocopherol-Behandlung zeigte eine Erhöhung beider Enzymaktivitäten und eine Abmilderung der LOOH-induzierten Veränderungen, besonders bei HT29 Zellen. Die LOOH-induzierte erhöhte Expression von COX-2 und VEGF war sowohl in HT29 als auch in LT97-3 Zellen nachweisbar. In diesem Zusammenhang zeigte γ -Tocopherol eine Schutzwirkung vor LOOH bei HT29 und α -Tocopherol bei LT97-3 Zellen. Eine Messung des Prostaglandin E_2 im Zellkulturüberstand mittels Elisa bestätigte die Schutzwirkung von γ -Tocopherol-Behandlung in LT97-3 Adenomzellen. In HT29 Kulturen wurde eine Verminderung der LOOH-induzierten VEGF Sekretion in das Medium durch α -Tocopherol beobachtet. Als zusätzliches Entzündungskriterium wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B mittels Dual-Luciferase Reporter Assay gemessen. Diese wurde durch LOOH Exposition deutlich erhöht und konnte durch 24h α -Tocopherol-Einwirkung signifikant gehemmt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen signifikante Schutzwirkungen der α - und γ -Tocopherole im Zusammenhang der Lipidperoxidation und dessen Auswirkungen auf intrazellulärer Ebene sowohl in Adenom- als auch in Karzinomzellen auf. Somit eignen sich diese Antioxidantien für weitere krebspräventive Studien, die allerdings noch durch in vivo Studien gezeigt werden müssen.

Abstract

Lipidhydroperoxides (LOOH) arise from heating polyunsaturated fatty acids in the presence of oxygen. These peroxides are able to induce further lipidperoxidase reactions in the cell membranes of the colon epithelial cells and to cause oxidative stress through the formation of free radicals.

Based on this knowledge the non-enzymatic protective mechanisms of α - and γ -tocopherol were studied by treating the carcinoma cell line HT29 and the adenoma cell lines LT97-2 and LT97-3 with LOOH. Through the use of Dichlorofluorescein-FACS it could be shown that LOOH-induced increases of the H_2O_2 production in HT29 and LT97-2 cells could be largely reduced by the concomitant addition of both tocopherols. The increase of H_2O_2 -formation caused by hematin-iron could be blocked by α -tocopherol in HT29 and LT97-3 cells.

In addition to their direct inactivation of reactive oxygen species tocopherols also induce cellular protective enzymes like Katalase and Superoxiddismutase and have an impact on the expression of inflammation-associated genes. Specifically, α -tocopherol-treatment caused an increase in both enzyme activities and a decline in LOOH-induced changes, especially in HT29 cells. Exposure to LOOH raised expression of COX-2 and VEGF in HT29 and LT97-3 cells. This effect was inhibited by γ -tocopherol in HT29 and by α -tocopherol in LT97-3 cells. Measurement of Prostaglandin E_2 in the cell culture supernatant through Elisa confirmed the protective mechanism of γ -tocopherol-treatment in LT97-3 adenoma cells. α -tocopherol also reduced LOOH-induced VEGF secretion into the medium of HT29 cultures. As an additional inflammation marker the activity of the transcription factor NF- κ B was measured by Dual-Luciferase Reporter Assay. This activity was increased significantly through LOOH exposition and could be reduced significantly through 24h α -tocopherol-treatment.

The results of this study demonstrate distinct protective mechanisms of α - and γ -tocopherols in relation to the lipid peroxidation and its effects on an intracellular basis both in adenoma cells as well as in carcinoma cells. This suggests cancer preventive activities of these antioxidants that need to be further tested in vivo.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
1 Einleitung	1
1.1 Krebserkrankungen.....	1
1.1.1 Epidemiologie der Krebserkrankungen weltweit	1
1.1.2 Epidemiologie der Krebserkrankungen in Österreich	2
1.1.3 Epidemiologie des Kolonkarzinoms weltweit.....	3
1.1.4 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms in Österreich.....	4
1.2 Mehrstufenprozess der Kanzerogenese	5
1.2.1 Initiation	8
1.2.2 Promotion	8
1.2.3 Progression	8
1.2.4 Hallmarks of Cancer.....	10
1.3 Deregulation des Wachstums in der Kolonkarzinogenese	11
1.4 Tumorentstehung in der Darmschleimhaut	13
1.5 Kolorektalkrebs und Ernährung.....	15
1.5.1 Lipide und Lipidperoxidation.....	16
1.6 COX-2 und der Arachidonsäuremetabolismus.....	17
1.7 VEGF und seine Rolle in der Angiogenese	19
1.8 Oxidativer Streß und VEGF	20
1.9 Zelluläre Schutzmechanismen	21
1.9.1 Mechanismen gegen freie Radikale	21
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung	25
3 Material und Methoden.....	27

3.1	Zellkultur	27
3.1.1	Material für die Zellkultur	27
3.1.2	Zelllinien	28
3.1.3	Passagieren der Zelllinien	29
3.1.4	Testsubstanzen	29
3.2	Neutralrottest zur Zellzahlbestimmung	30
3.3	FACS-Analyse	30
3.3.1	Dichlorofluorescein-FACS	31
3.4	Analyse auf RNA Ebene	32
3.4.1	RNA-Isolation aus Zellkulturzellen	32
3.4.2	cDNA-Synthese:	33
3.4.3	Real-time PCR	33
3.5	Untersuchung der Schutzmechanismen	35
3.5.1	Superoxiddismutase Activity Assay Kit (BioVision)	35
3.5.2	Katalase Assay Kit (Biovision)	37
3.6	Lipofektion	39
3.6.1	Dual Luciferase Assay	39
3.6.2	Dual Luciferase Reporter 1000 Assay	39
3.7	Analyse auf Protein- und Aktivitätsebene	41
3.7.1	Prostaglandin E ₂ -Elisa	41
3.7.2	VEGF-Elisa	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Wirkung der Tocopherole auf die Hydrogenperoxid-Entwicklung	45
4.1.1	Zellviabilität mit α -Tocopherol	45
4.1.2	Untersuchung der intrazellulären Hydrogenperoxid-Entwicklung	46
4.1.3	Neutralrotbestimmung und Hydrogenperoxid-Entwicklung mit Hämatin	50

4.2	Auswirkungen der Tocopherole auf Genexpressionsniveau	52
4.2.1	Die Hemmwirkung der Tocopherole auf die COX-2-Expression.....	52
4.2.2	Die Schutzwirkung der Tocopherole auf die VEGF-Expression	54
4.3	Die Schutzmechanismen: Antioxidative Enzyme und	
	Tocopherole als Radikalfänger	56
4.3.1	Katalase Aktivität und die Beeinflussung durch Tocopherole	56
4.3.2	Superoxiddismutase und die Beeinflussung durch Tocopherole	60
4.4	Auswirkungen der Tocopherole auf die Expression	
	des Transkriptionsfaktors NF- κ B	63
4.5	Nachweis der Schutzfunktion von Tocopherolen auf Proteinniveau	64
4.5.1	Bestimmung der PGE ₂ -Proteinmenge mittels ELISA.....	64
4.5.2	Bestimmung der VEGF-Proteinmenge mittels ELISA	66
5	Diskussion	69
5.1	Hydrogenperoxidentwicklung durch Lipidhydroperoxide	69
5.1.1	Tocopherole als nicht-enzymatische Schutzsysteme	69
5.1.2	Enzymatische Schutzsysteme und die Beeinflussung durch Tocopherole.....	71
5.2	Wirkung der Tocopherole auf Genexpression.....	72
5.2.1	Hemmung der Tocopherole auf die COX-2 Expression	72
5.2.2	Schutzwirkung der Tocopherole auf die VEGF-Expression.....	72
5.2.3	Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	73
5.3	Schlussbetrachtung:	74
6	Literaturverzeichnis	VI
7	Abbildungsverzeichnis.....	XVI
8	Tabellenverzeichnis	XX
9	Curriculum Vitae.....	XXII

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

1.1.1 Epidemiologie der Krebserkrankungen weltweit

Krebserkrankungen zählen nach kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in entwickelten Ländern. 2008 wurden rund 7,6 Millionen Todesfälle aufgrund von Krebserkrankungen gezählt (WHO, 2011). Bei 30% der an Krebs Verstorbenen besteht ein Zusammenhang zwischen der Krebsentstehung und den 5 häufigsten Risiken: zu hoher Body Mass Index, geringe Vitaminaufnahme durch Obst und Gemüse, zu wenig physische Bewegung, zu hohe Alkohol- und zu hohe Tabakaufnahme (WHO, 2011).

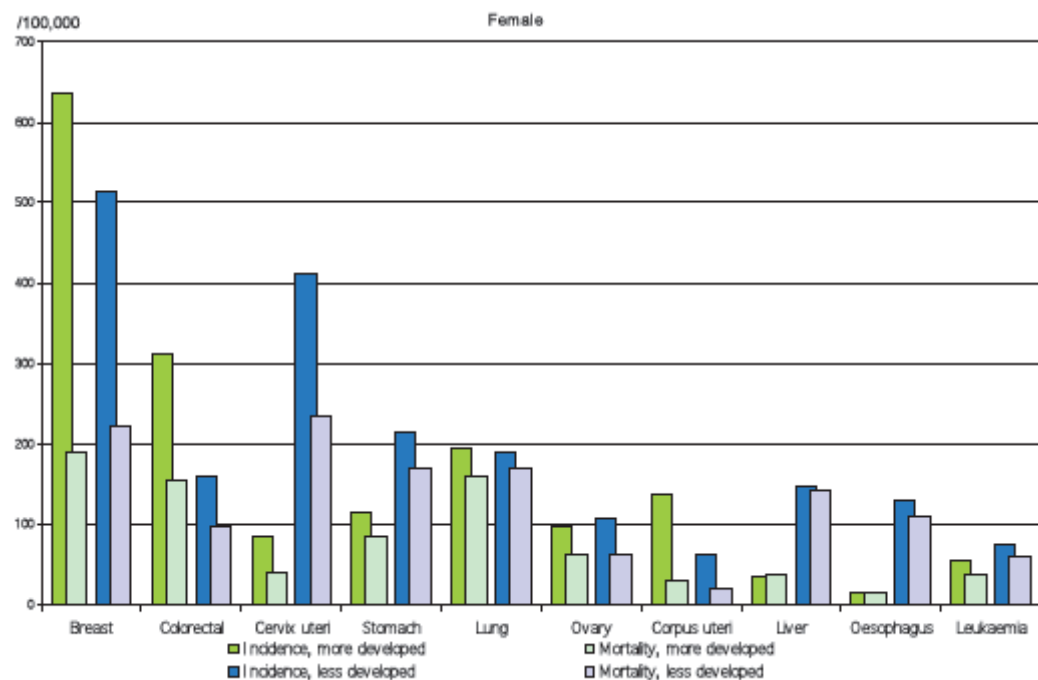


Abb. 1: Neuerkrankungen und Sterberate der häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen in industrialisierten Ländern und Entwicklungsländern (Boyle und Levin, 2008).

Während in entwickelten Ländern bei Frauen die häufigsten Krebserkrankungen Lunge, Brust und Kolon betreffen, zählen in Entwicklungsländern zusätzlich Magen- und Gebärmutterhalskrebs zu den häufigsten Erkrankungen mit einer hohen Mortalitätsrate (Boyle und Levin, 2008). Das Zervixkarzinom ist in Entwicklungsländern die häufigste Krebstodesursache. Sie könnte durch präventive medizinische Versorgung, in Form von HPV Impfungen und der Entfernung von Gebärmutterhalskrebsvorstufen, zu einem großen Maße in ihrer Inzidenz und Mortalität verringert werden (Denny, 2005).

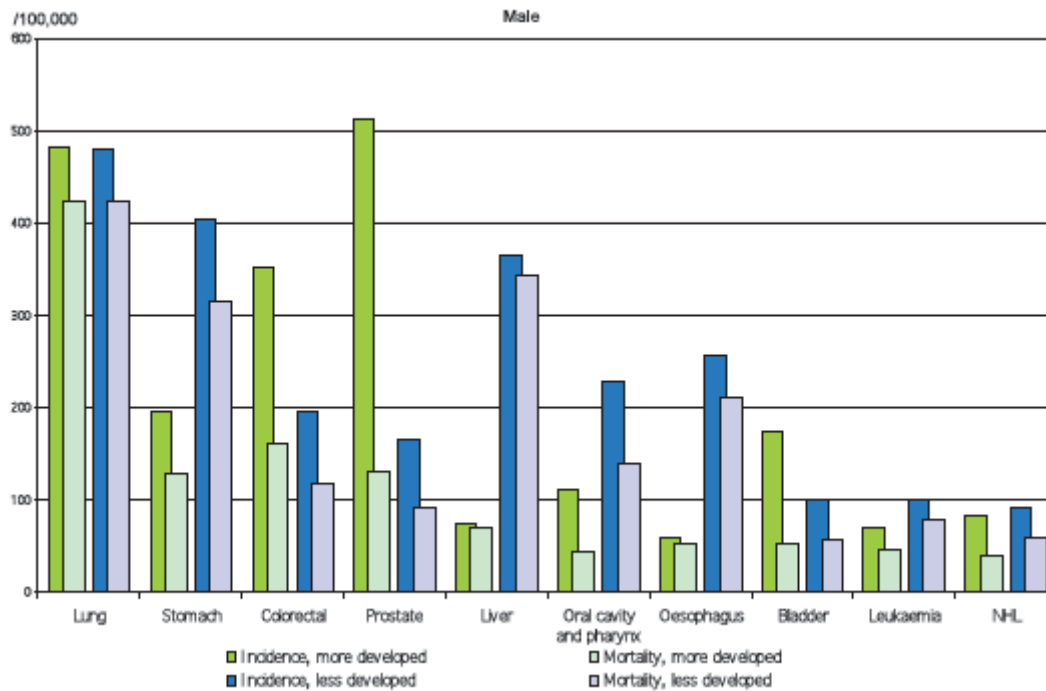


Abb. 2: Inzidenz und Mortalität der häufigsten Krebserkrankungen bei Männern in industrialisierten Ländern und Entwicklungsländern (Boyle und Levin, 2008).

Die häufigsten Krebserkrankungen in entwickelten Ländern betreffen bei Männern Prostata, Lunge und Darm. In Entwicklungsländern sind die höchsten Inzidenzen und Sterberaten bei Lunge, Magen und Leber zu verzeichnen (Boyle und Levin, 2008). Ein wichtiger Vergleich zeigt auf, dass einige Krebserkrankungen wie die der Leber und des Magens, hervorgerufen durch Infektionen, in ihrer Inzidenz durch medizinische Vorsorge deutlich minimiert werden könnten (Rehman et al., 2009).

1.1.2 Epidemiologie der Krebserkrankungen in Österreich

In Österreich erkranken jährlich 38.000 Menschen an Krebs, der auch hier die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen darstellt. Im Jahr 2009 wurde bei 37.039 Österreichern eine Krebserkrankung diagnostiziert. Davon waren 17.413 Frauen und 19.626 Männer betroffen. Mit einer Mortalitätsrate im Jahr 2009 von 9.121 bei Frauen und 10.426 bei Männern, sind maligne Erkrankungen für ein Viertel der gesamten Todesfälle verantwortlich (Austria, 2011). Ein Viertel aller Krebserkrankungen bei Männern betrifft die Prostata. Jedoch ist bei einer hohen Inzidenzrate eine verminderte Mortalität aufgrund frühzeitiger PSA-Tests zu verzeichnen (Austria, 2011). Bösartige Tumore der Lunge und des Darmes zählen mit jeweils 14% ebenfalls zu den häufigsten Erkrankungen. Die häufigste Tumorlokalisation bei Frauen betrifft mit 29% die Brust. Darm, Lunge und Gebärmutter folgen in der Häufigkeitsskala (Abb. 3).

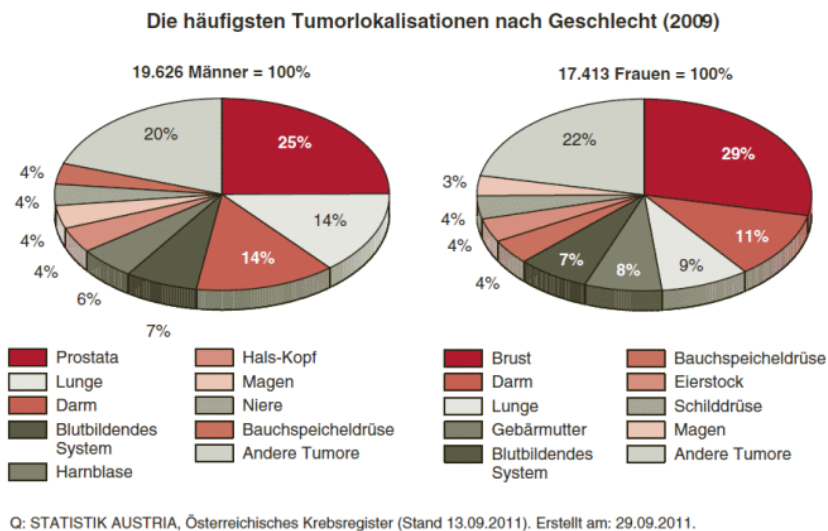


Abb. 3: Häufigste Tumorlokalisationen nach Geschlecht (Statistik Austria, 2011),

(http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/krebsinzidenz_im_ueberblick/index.html).

1.1.3 Epidemiologie des Kolonkarzinoms weltweit

Weltweit, unter allen Tumorlokalisationen, ist Kolorektalkrebs bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung und bei Männern die dritthäufigste. Australien, Neuseeland, Europa und Nordamerika weisen die höchsten Inzidenzraten auf, während in Afrika und Nord-Zentral-Asien eine geringere Anzahl an Neuerkrankungen nachgewiesen wurde (Jemal et al., 2011). Als Hauptrisikofaktoren gelten Rauchen, Alter, Geschlecht, genetische Prädisposition für Kolorektalkrebs, Verzehr von Rind, Schwein, Lamm, prozessiertem Fleisch und Alkohol (Wei et al., 2004). Weltweit durchgeführte Screeningprogramme senken durch Entfernen präkanzerogener Polypen die Mortalitätsrate nachweislich (Center et al., 2009). Ab dem 65. Lebensjahr steigt die Zahl an Vorsorgeuntersuchungen, jedoch wird ein deutlich geschlechtsspezifischer Unterschied gesehen. Männer tendieren mit 74% mehr zu Kolonoskopien als Frauen mit 68% (Karner-Hanusch und Marian, 2006). Im zeitlichen Verlauf, von 1985 bis 2009, wird ein Rückgang der Inzidenz und Mortalitätsrate gezeigt (Abb. 4). Dies ist zum einen Teil auf verstärkte Screeningprogramme, jedoch auch auf gesündere Ernährung zurückzuführen (Karner-Hanusch und Marian, 2006).

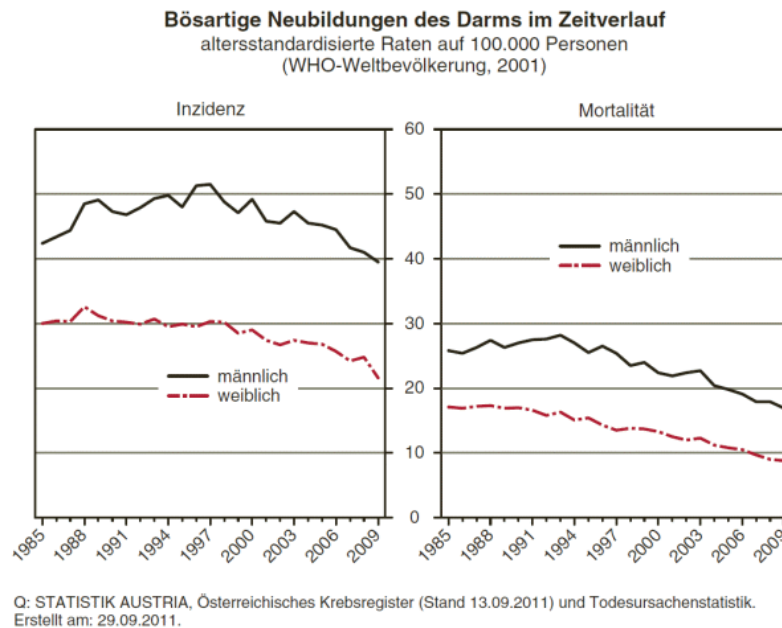


Abb. 4: Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms weltweit (Statistik Austria 2011),
(http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html).

1.1.4 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms in Österreich

In Österreich ist das kolorektale Karzinom mit 11% die zweithäufigste Krebserkrankung der Frauen und mit 14%, neben Lungenkrebs, ebenfalls die zweithäufigste Krebserkrankung der Männer (Leitner, 2009). Die Inzidenzrate der Männer liegt um das 1,8 fache höher und die Sterberate um das 1,9 fache höher als die der Frauen (Zielonke, 2012). Für Männer besteht somit ein höheres Risiko an Kolorektalkrebs zu erkranken. In den letzten 20 Jahren ist das Risiko bis zum 75. Lebensjahr an Darmkrebs zu erkranken von 1,9% auf 1,1% gesunken. Dieser Effekt ist auf verstärkte Krebsfrüherkennungsuntersuchungen und das Entfernen prämaligener Läsionen zurückzuführen (Austria, 2011).

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei Männern bei 66% und bei Frauen bei 64% (Haidinger et al., 2006). Generell ist ein altersspezifischer Trend sowohl in der Inzidenz als auch in der Mortalität zu erkennen (Abb. 5). Mit steigendem Alter erhöht sich die Wahrscheinlichkeit an Kolorektalkrebs zu erkranken.

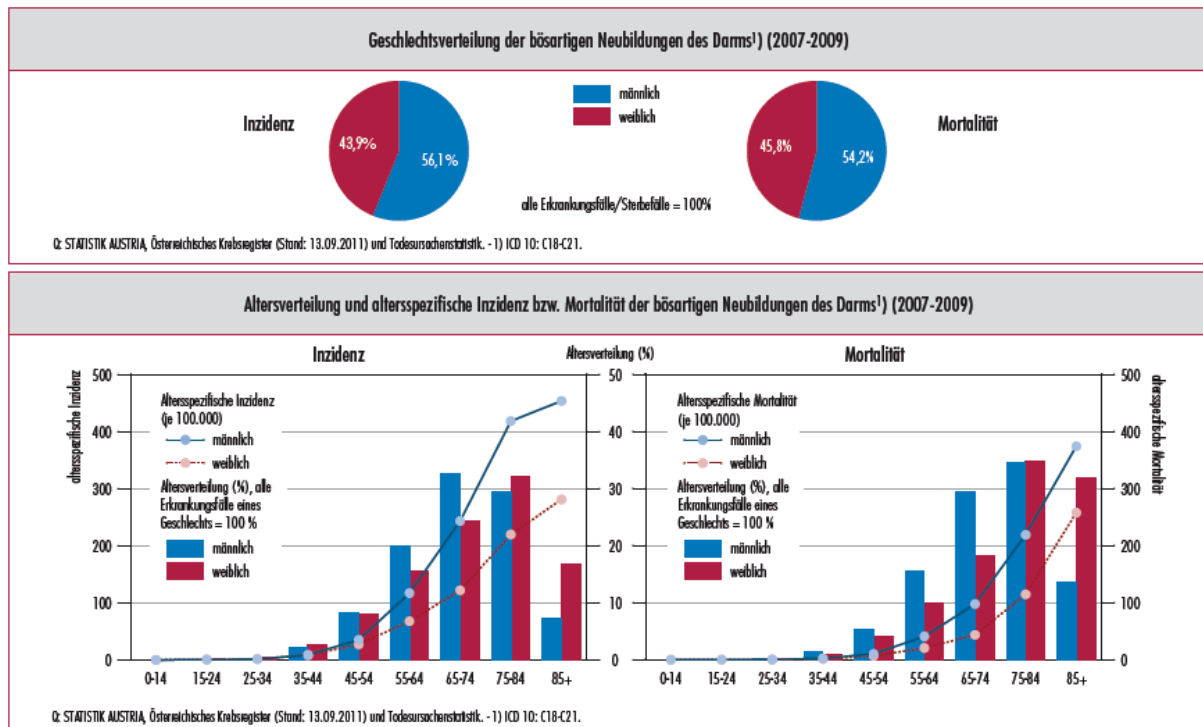


Abb. 5: Geschlechtsverteilung, Altersverteilung und altersspezifische Inzidenz und Mortalität des Kolonkarzinoms in Österreich (Zielonke, 2012).

1.2 Mehrstufenprozess der Kanzerogenese

Die Kanzerogenese unterliegt einem schrittweisen Prozess welcher ausgehend von normalen Zellen, einhergehend mit gesteigerter Zellproliferation und gestörten Wechselwirkungen in Wachstum und Differenzierung der Zellen, zu malignen Tumoren führt. Die entarteten Zellen der Tumore sind im Stande das gesunde, umgebende Gewebe zu infiltrieren, zu zerstören und Fernmetastasen zu bilden, welche sich in anderen Organen festsetzen um Sekundärtumore zu bilden. Auslöser dieser Entwicklung sind in 80-90% aller Krebserkrankungen exogene Ursachen. Chemische- und hormonwirksame Substanzen, radioaktive- und UV-Strahlung, Viren, Bakterien, Parasiten, Stoffe die chron. Entzündungen auslösen und Überernährung beeinflussen die Wechselwirkungen der zellulären Regelkreise und begünstigen somit den Verlauf der Kanzerogenese. Diesen Wechselwirkungen liegen zwei unterschiedliche Ursachen zugrunde:

- Gentoxische Wirkungen verursachen durch Mutationen irreversible Veränderungen des Erbguts. Energiereiche Strahlung und chemische Karzinogene sind Hauptverursacher dieser Mutationsentstehung.
- Nicht-gentoxische Wirkungen treten mit anderen Zielmolekülen in Kontakt. Sie verstärken die Selektion indem sie die Frequenz von Wachstums- und Überlebenssignalen an bereits mutierten Zellen erhöhen. Dies führt zu selektivem

Wachstum präaligner Läsionen. Zu den nicht-gentoxischen Noxen zählen hormonwirksame Substanzen, Stoffe, welche chronische Entzündungen auslösen und Überernährung, welche die Synthese von Hormonen und Wachstumsfaktoren erhöhen.

Endogene Krebsrisikofaktoren treten sehr selten auf, führen jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls zu Tumoren. Zu ihnen zählen ererbte Mutationen in den Tumorgenen, mitogene Hormone sowie die erhöhte Konzentration von Sauerstoff und anderen Radikalen im Gewebe.

Durch regulatorische Veränderungen und Mutationen bekommen diese Zellen einen Wachstumsvorteil (Marian, 2011), (Schulte-Hermann et al., 2004).

Es werden 3 Stadien unterschieden (Abb. 6): Initiation, Promotion und Progression.

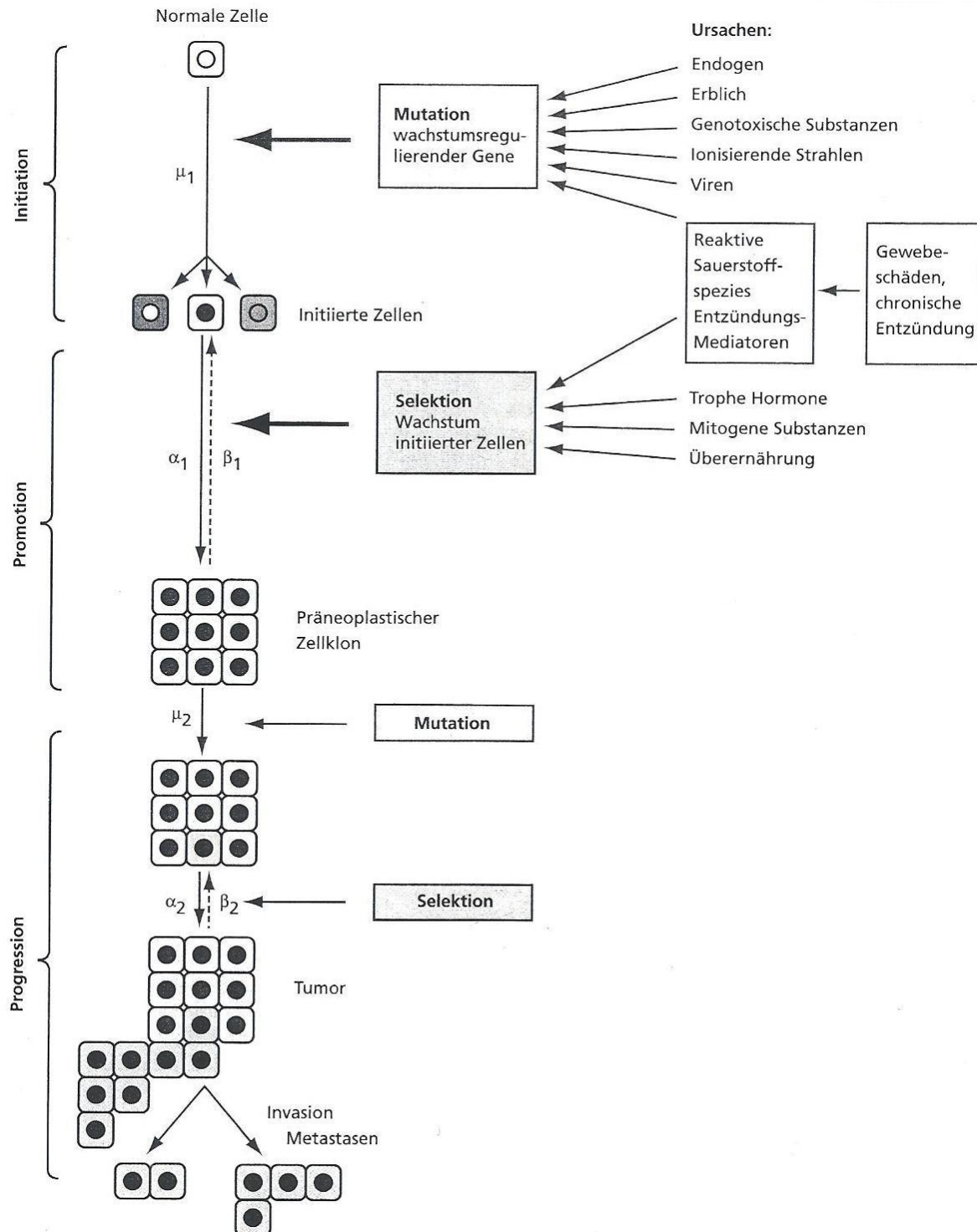


Abb. 6: Mehrstufenprozess der Kanzerogenese (Schulte-Hermann et al., 2004).

Die Schritte der Initiation, Promotion und Progression sind für die Entwicklung einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle verantwortlich. α =Replikationsrate, β =Absterberate der Zellen, μ =Bildungsrate initiiert/mutierter Zellen.

1.2.1 Initiation

Die Initiation einzelner Zellen im Gewebe findet aufgrund der Einwirkung exogener und/oder endogener Faktoren statt. Aufgrund gentoxischer Noxen, wie chemische Karzinogene und energiereiche Strahlung, werden veränderte Zellen erzeugt. Die Sensitivität gegenüber der Initiation ist in proliferationsfähigem Gewebe deutlich erhöht. Junge Individuen sind dadurch einer stärkeren Gefährdung durch Kanzerogene ausgesetzt als adulte Organismen. Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber gentoxischer Umweltnoxen zeigt sich bei proliferierenden Zellen in der späten G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus.

Dieser erste Schritt zur malignen Entartung kann in verschiedenen Organen gleichzeitig erfolgen, ist irreversibel und wird somit an die Tochterzellen weitergegeben (Schulte-Hermann et al., 2004), (Marian, 2011).

1.2.2 Promotion

Der Prozess der Promotion wirkt auf bereits initiierte Zellen und ist für die Ausbildung präneoplastischer Zellklone verantwortlich (Abb. 6). Die Ausbildung benigner Tumore kann Wochen, Monate oder Jahre dauern. Tumorpromotoren liefern den initiierten Zellen Wachstums- und Überlebensfaktoren, wodurch diese sich durch Selektion einen Wachstumsvorteil verschaffen. Dies führt zu einer Vergrößerung der initiierten Zellpopulationen, zu benignen Tumoren und erhöht die Entstehung eines malignen Tumors durch anschließende Progression. Tumorpromotoren wirken organspezifisch während Überernährung eine generell promovierende Wirkung in vielen Organen aufweist (Marian, 2011), (Schulte-Hermann et al., 2004).

1.2.3 Progression

Die Entstehung eines malignen Tumors aus präneoplastischen Zellpopulationen und benignen Tumoren verläuft im Stadium der Progression. Mutation, Selektion und genetische Instabilität sind die Ursachen dieser Entwicklung. Verlust oder Inaktivierung von Reparaturgenen der DNA verursachen weitere Mutationen, welche sich in den Subklonen manifestieren und den Prozess der malignen Entartung beschleunigen. Tumore sind daher mit Zellpopulationen unterschiedlichen Genotyps immer heterogen (Marian, 2011), (Schulte-Hermann et al., 2004).

Weitere wichtige Aspekte der Progression sind die unbeschränkte Zellproliferation der malignen Zellen, Invasion in das umliegende Gewebe und Metastasierung. Die Hauptursachen dieser zellulären Veränderungen sind die erhöhte Synthese von

Wachstumsfaktoren und Energie, Hemmung der Apoptose und der Prozess der Angiogenese um den Sauerstoff- und Nährstoffbedarf für das Tumorgewebe zu decken (Schulte-Hermann et al., 2004), (Marian, 2011).

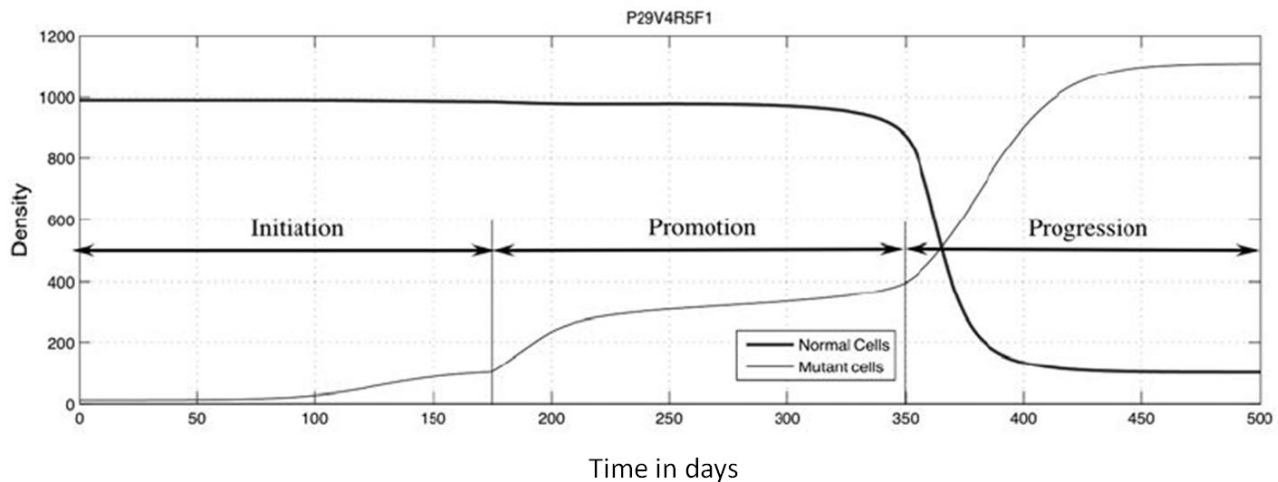


Abb. 7: Die Phasen der Initiation, Promotion und Progression (Vincent und Gatenby, 2008).

Abbildung 7 stellt die relative Dichte normaler und mutierter Zellen im Tumorgewebe dar. Wie aus dem Diagramm ersichtlich sind die Phasen der Initiation und Promotion längeren Latenzzeiten unterworfen. Es zeigt sich eine starke Erhöhung der mutierten Zellen in der Phase der Progression. Diese Phase verläuft meist rasch mit Ausbildung maligner Zellen, welche einen proliferativen Vorteil gegenüber normalen Zellen besitzen. Diese Selektion beruht auf zellulären Adaptionen von mutierten Zellen gegenüber Hypoxie und saurer Umgebung, wodurch normale Zellen absterben. Das Tumor Microenvironment, welches durch Hypoxie charakterisiert ist, führt zu einer weiteren genetischen Instabilität, welche die Tumorprogression erhöht. Durch Hypoxie wird HIF1 α hochreguliert und ist durch weitere VEGF-Aktivierung für die Induktion der Angiogenese verantwortlich. Gesunde, normale Zellen sterben durch das toxische Umfeld ab und mutierte Zellen erhöhen durch weitere Mutationen ihre Proliferationsrate (Vincent und Gatenby, 2008).

1.2.4 Hallmarks of Cancer

Wesentliche Eigenschaften von Tumorzellen und Tumoren sind nach Hanahan und Weinberg, 2000:

- 1) Unempfindlichkeit für aktiven Zelltod
- 2) Aufrechterhalten proliferativer Signale
- 3) Verlust der Sensitivität für wachstumshemmende Signale
- 4) Aktivierung der Gewebe-Invasion und Metastasierung
- 5) Unbegrenzt replikatives Potential bei ausreichender Versorgung mit Energie und Sauerstoff
- 6) Versorgung mit Blut durch induzierte Angiogenese

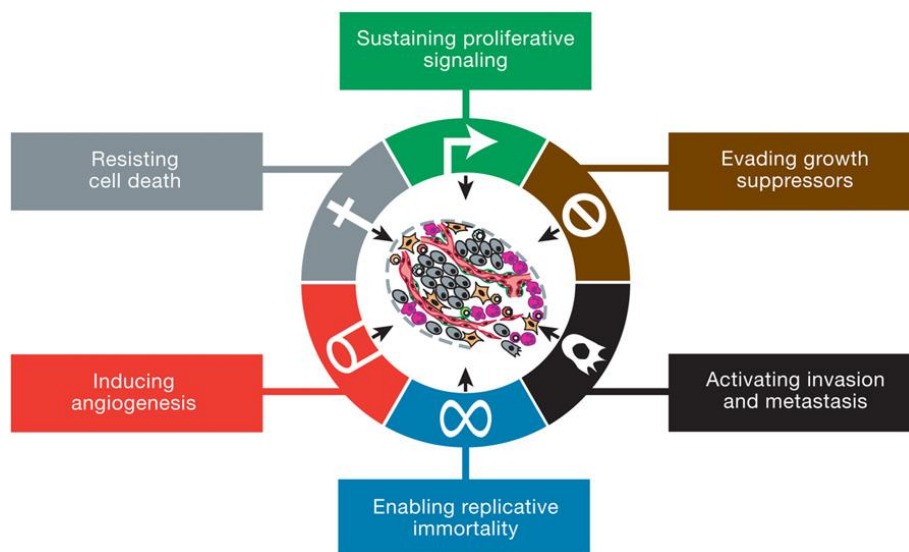


Abb. 8: „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan und Weinberg, 2000).

Diese Eigenschaften werden im Laufe der Kanzerogenese schrittweise erworben. Es herrscht keine allgemeine Regelung der Abfolge dieser Eigenschaften. Jedoch kann für bestimmte Organe eine bevorzugte Reihenfolge nachgewiesen werden. Mutationen in p53 treten früh in Ösophagus und Haut, jedoch spät in der Kolonkarzinogenese auf (Marian, 2011).

Das Tumorwachstum wird durch wachstumsstimulierende und wachstumshemmende Signale beeinflusst. Onkogene, welche durch Mutation aus Protoonkogenen entstehen, stimulieren die Zellproliferation und sind durch Überexpression verantwortlich für die weitere Kanzerogenese. In diese Klasse sind TGF α , EGF-Rezeptor, erbB2 und Ras einzuordnen, welche ausschlaggebend für die Entstehung vieler Karzinome des Menschen sind. Mehr als

20% der menschlichen Tumore sind auf Punktmutationen der Ras Gene zurückzuführen (Marian, 2011), (Weinberg, 2007).

Tumorsuppressorgene vermitteln wachstumshemmende Signale und inhibieren das Tumorstadium. Inaktivierung dieser Gene wie p53, welches bei DNA Schäden die Induktion der Apoptose einleitet und Rb, welches die Zellteilung reguliert, führen zu einer Tumorentstehung (Marian, 2011), (Weinberg, 2007).

1.3 Deregulation des Wachstums in der Kolonkarzinogenese

Der Darm ist mit einer Schleimhaut ausgekleidet, welche sich kontinuierlich erneuert. Die Darmschleimhaut besteht aus einem einschichtigen Epithel, welches durch die Basalmembran vom darunter liegenden Bindegewebe getrennt ist. Dieses Epithel ist in Krypten eingefaltet und besitzt eine hohe Zellteilungsrate. Im unteren Teil jeder Krypte liegen Stammzellen welche kontinuierlich Tochterzellen bilden. Diese Tochterzellen besitzen das Potential für 7-8 weitere Teilungen und wandern in Richtung Lumen, wo sie zu Enterozyten und Goblet-Zellen ausdifferenzieren und ihre Teilungsfähigkeit einstellen. Durch initiierten apoptotischen Zelltod werden die abgestorbenen Zellen in das Darmlumen extrudiert. Nach 4-8 Tagen werden die Zellen der Darmschleimhaut durch neue Zellen ersetzt (Schulte-Hermann et al., 2004), (Lipkin, 1974), (Barker et al., 2007).

Kommt es durch genotoxische Noxen zu einer Initiation der Stammzellen, so erhalten die mutierten Tochterzellen die Fähigkeit der Proliferation aufrecht. Sowohl in der obersten Epidermisschicht als auch in Richtung Lumen konnte mittels Einbau von Tritium-Thymidin bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis und Patienten mit einem einfachen adenomatösen Polypen eine hohe DNA-Synthese-Rate nachgewiesen werden (Deschner und Lipkin, 1975). Die mutierten Stammzellen können sich vermehren und verdrängen durch selektive Mechanismen normale Stammzellen. Diese monoklonale Umwandlung hat zur Folge, dass stark proliferierende, mutierte Tochterzellen die Krypte füllen und die Entstehung eines Polypen fördern (Humphries und Wright, 2008).

Die Transformation von normalen Epithelzellen zu Karzinomen steht im Zusammenhang mit einer starken Apoptose-Inhibierung. Kolorektale Karzinome zeigen im Vergleich zu adenomatösen Polypen einen höheren Verlust der Apoptose-Fähigkeit (Bedi et al., 1995).

Die Expression des Protoonkogens Bcl-2 erhält die Zellaktivität durch Inhibierung der Apoptose. In normalen Krypten des Kolons wird Bcl-2 nur in der proliferativen Zone und im

unteren Drittel exprimiert, um eine regelmäßige Zellerneuerung zu gewährleisten. Differenzierte Zellen welche in Richtung Lumen migrieren, stellen ihre Bcl-2 Expression ein und sterben durch programmierten Zelltod (Korsmeyer, 1992), (Hockenbery et al., 1991).

In kolorektalen Karzinomen wurde die höchste Bcl-2 Expression im malignen Epithelium gefunden. Ebenfalls konnte in adenomatösem Gewebe eine stark erhöhte Bcl-2 Expression nachgewiesen werden (Bedi et al., 1995).

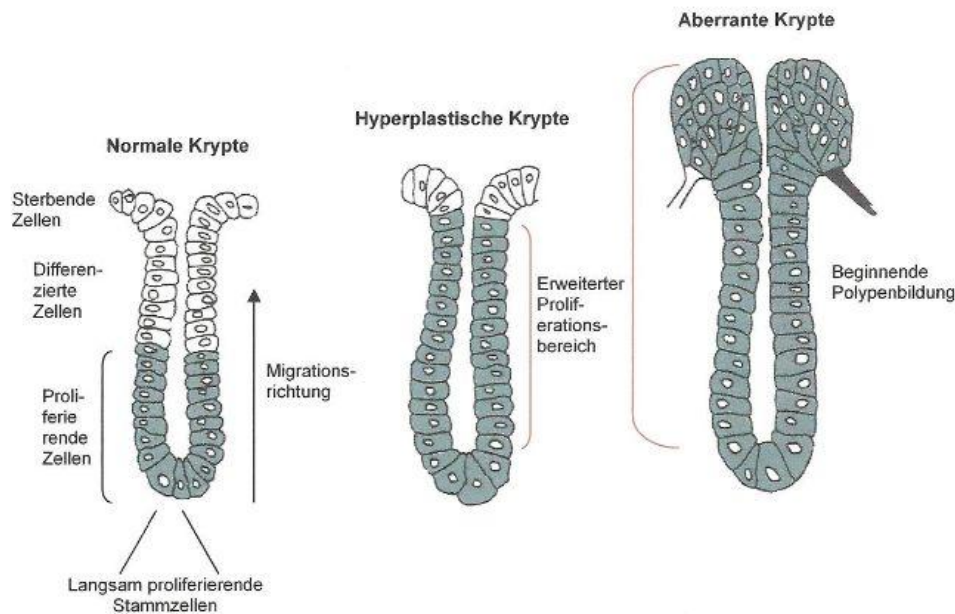


Abb. 9: Normale, hyperplastische und abberante Krypte (Schulte-Hermann et al., 2004).

Normale Darmkrypten sind durch langsam proliferierende Stammzellen am unteren Pol jeder Krypte charakterisiert. Durch Initiation in diesem Bereich entsteht ein erweiterter Proliferationsbereich in Richtung Darmlumen mit einer Verzögerung von Differenzierung und Zelltod. Diese hyperplastischen Krypten formen nach 5-8 Wochen Foci aberranter Krypten, welche eine hohe Zellzahl an proliferierenden Zellen entlang der ganzen Krypte und vergrößerte Lumina aufweisen (Schulte-Hermann et al., 2004).

1.4 Tumorentstehung in der Darmschleimhaut

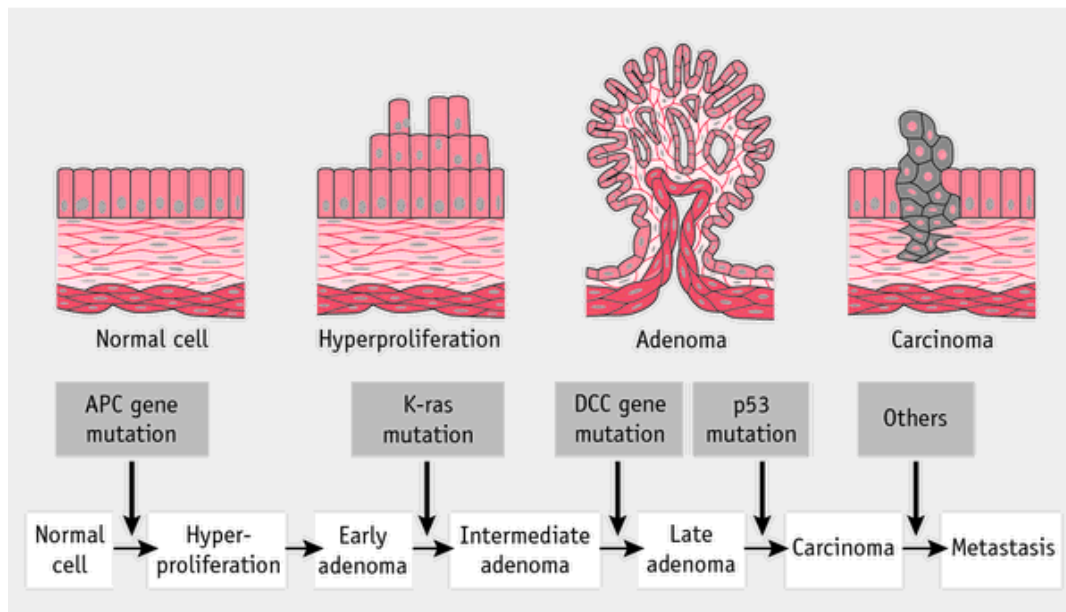


Abb. 10: Mehrstufenprozess der Kanzerogenese. Schrittweise genetische Veränderungen führen zu einem kolorektalen Karzinom (Aspinall und Taylor-Robinson, 2001).

Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms aus normalen Zellen wird durch multiple Mutationen hervorgerufen (Abb. 10). APC Mutationen initiieren den neoplastischen Prozess, welcher zu Hyperproliferation und einer weiteren Bildung von Adenomen führt. Die Mehrheit der adenomatösen Polypen besitzt Mutationen auf beiden APC-Genloci (Luebeck und Moolgavkar, 2002). Das Onkogen K-RAS benötigt zur Aktivierung nur eine Mutation auf einem Allel. Weitere Tumorsuppressorgene, welche in der Entwicklung vom Adenom zum Karzinom beteiligt sind, wie DCC, DPC4, JV18-1 benötigen Mutationen auf beiden Allelen um inaktiv zu werden. Durch Mutationen, meist Punktmutationen im Tumorsuppressorgen p53 - es muss nur ein Allel betroffen sein - erlangen die Zellen eine genetische Instabilität durch Inaktivierung des Transkriptionsfaktors. Gene für die DNS-Reparatur geschädigter Zellen und das Apoptose induzierende Protein Bax können durch p53 Inaktivierung nicht exprimiert werden. Es kommt zu einer Vermehrung mutierter Zellen mit weiteren Mutationen, dem sogenannten Mutatorphänotyp, welcher die genetische Instabilität verursacht und zur Entstehung von Karzinomen führt (Kinzler und Vogelstein, 1996), (Marian, 2011), (Fearon und Vogelstein, 1990).

Eine zweite Form der genetischen Instabilität ruft die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) hervor. Diese ist gekennzeichnet durch Mutationen in den Mikrosatelliten während der Replikation. Sie tritt mit dem Verlust der Funktion des Mismatch-Reparatursystems auf. In 15-20% der nicht erblich bedingten kolorektalen Tumore und in >95% der kolorektalen Karzinome bei

Patienten mit HNPCC (Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom), eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, welche ein stark erhöhtes Risiko für Darmkrebs darstellt, wurde eine Inaktivierung der DNA-Mismatch-Reparaturgene festgestellt. Diese Inaktivierung stellt die Ursache der MSI der kolorektalen Karzinome dar (Grady und Carethers, 2008).

Es existieren zwei gegensätzliche Theorien welche die Transformation normaler Zellen in ein kolorektales Adenom erklären. Das bottom-up-Model besagt, dass Adenome im Darmlumen aus mutierten Stammzellen, welche im unteren Bereich der Krypte liegen, entstehen. Vereinzelte Adenome können später in benachbarte Krypten wachsen, der Ursprung ihrer Transformation ist jedoch auf die Stammzellen im Kryptenboden zurückzuführen (Preston et al., 2003).



Abb. 11: Top-down Hypothese (Shih et al., 2001).

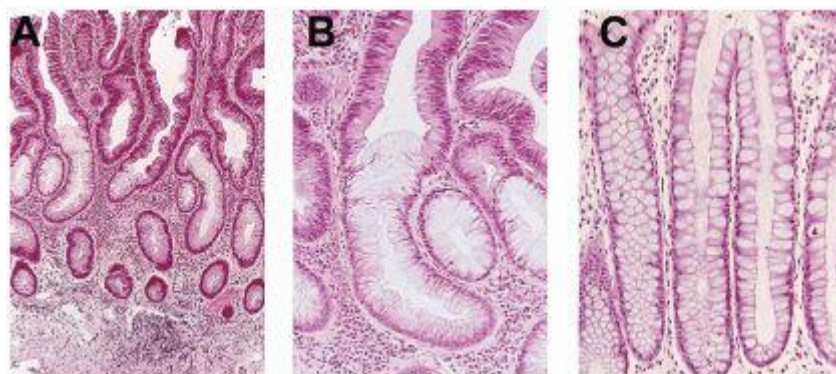


Abb. 12: Die Top-down Hypothese anhand von Hämatoxilin und Eosin gefärbten adenomatösen (A, B) und normalen Gewebe der Darmschleimhaut (C) (Shih et al., 2001).

Laut zweiter Hypothese, der Top-down-Theorie (Abb. 11) wandern genetisch veränderte Zellen von der intra-kryptalen Zone in den unteren Bereich der Krypte, um eine neue zu formieren (Shih et al., 2001).

1.5 Kolorektalkrebs und Ernährung

Die Entstehung von kolorektalen Karzinomen basiert sowohl auf erblichen als auch auf ernährungsbedingten Mutationen. Nahrungsbestandteile wirken ebenfalls durch epigenetische Regulationen des Zellwachstums auf den Organismus ein. Als wachstumsstimulierend gelten Gallensäuren, 1,2-Diglyceride und Prostaglandine. Obst und Gemüse hingegen besitzen protektive Substanzen. Karotinoide, Flavonoide, natürliche Ballaststoffe, Ca^{2+} und die Vitamine A, D und E weisen hohe schützende Wirkungen im Zusammenspiel der Krebsprophylaxe auf (Marian, 1996).

Prospektive Studien zeigen einen Zusammenhang von Übergewicht und der Entstehung von Kolorektalkrebs. Veränderungen des Geschlechtshormonhaushaltes (Androgene, Östrogene und Progesterone), Hochregulation von Insulin und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF1) stehen in starker Abhängigkeit zu Übergewicht (Bianchini et al., 2002). Geschlechtshormone regulieren das Gleichgewicht zwischen zellulärer Differenzierung, Proliferation und apoptotischem Zelltod und fördern das selektive Wachstum von präneoplastischen und neoplastischen Zellen (Dickson et al., 1990). Insulin und IGF1 bewirken eine Stimulation der Zellproliferation, Inhibierung der Apoptose und eine Förderung der Angiogenese (Khandwala et al., 2000).

Übergewichtige Männer besitzen ein höheres Risiko an Darmkrebs zu erkranken als Frauen (Calle und Thun, 2004). In diesem Zusammenhang spielt die zentrale Fettverteilung bei Männern eine große Rolle. Ein erhöhter Taillenumfang und eine erhöhte Waist-to-Hip Ratio korrelieren stark mit der Entwicklung von Kolorektalkrebs und größeren Adenomen (Giovannucci et al., 1995). Bei Frauen zeigte sich eine höchst protektive Wirkung durch postmenopausale Hormontherapie gegenüber dem Risiko an Kolorektalkrebs zu erkranken (Calle et al., 1995).

Die physikalische Aktivität erniedrigt die Anfälligkeit für Kolorektalkrebs nachweislich (Potter, 1999). Eine hohe Konsumation von Obst, Gemüse und Folsäure reduziert das Risiko. Ein Polymorphismus im Gen für das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase, welches im Folsäure Metabolismus vorkommt, steht im Zusammenhang mit Kolonkrebs. Die Aufnahme von Alkohol erhöht das Darmkrebsrisiko, konnte jedoch durch Folsäure-Einnahme verringert werden (Willett, 2000).

Metaanalysen zeigen, dass gepökeltes und rotes Fleisch mit einem erhöhten Risiko für Kolorektalkrebs einhergehen. Eine hohe Aufnahme von Rindfleisch und gepökeltem

Schweinefleisch gelten als tumorfördernd in der Kolonkarzinogenese. Das in ihnen enthaltene Häm-Eisen erhöht die Lipidperoxidation der Fettsäuren aus dem Fleisch. Die direkte Behandlung mit Hämatin auf kolorektalen Tumorzellen zeigte eine DNA-Schädigung über H_2O_2 -Bildung durch Hämoxxygenase (Glei et al., 2006). Nitrosamine, welche bei der Pökellung von Fleisch entstehen, wirken karzinogen. In einer Studie an Ratten, welche gepökeltetes Schweinefleisch mit Nahrungsergänzung wie α -Tocopherol und Calcium verzehrten, konnte die weitere Krebsentwicklung im Kolon gehemmt werden (Corpet, 2011).

Eine hohe Aufnahme in der Ernährung von mehrfach ungesättigten ω -Fettsäuren stimuliert den Verlauf der Kolonkarzinogenese durch Zunahme von oxidativen DNA-Schäden, Erhöhung der Zellproliferation und Veränderungen der Hormone und Wachstumsfaktoren (Bartsch et al., 1999).

Die aus Fischöl gewonnenen ω -3-Fettsäuren besitzen hingegen eine protektive Wirkung gegenüber Krebs. Sie erhöht die Aktivität von Enzymen und Proteinen, welche die intrazellulären Signalwege und die Zellproliferation beeinflussen. ω -9-Fettsäuren, welche auch in Olivenöl vorkommen, enthalten ebenfalls eine protektive Wirkung (Bartsch et al., 1999).

1.5.1 Lipide und Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation ist eine Kettenreaktion eines freien Radikal-Prozesses, welcher aus 3 Abschnitten besteht: Initiation (Reaktion 1), Propagation-Kreislauf (Reaktionen 2 und 3) und Termination (Reaktion 4) (Wagner et al., 1994):

1. Reaktion: $\text{L-H} + \text{X}^* \rightarrow \text{L}^* + \text{X-H}$
2. Reaktion: $\text{L}^* + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^*$
3. Reaktion: $\text{LOO}^* + \text{L-H} \rightarrow \text{L}^* + \text{LOOH}$
4. Reaktion: $2(\text{LOO}^*) \rightarrow$ Es entsteht kein radikales Produkt.

Mehrfachungesättigte Fettsäuren (LH) besitzen eine allylische C-H-Bindung welche besonders oxidationslabil ist. Durch eine Reaktion mit Radikalen (Reaktion 1) können die Wasserstoffatome leicht abgespalten werden und es entsteht ein Lipidalkylradikal. Durch Addition mit molekularem Sauerstoff wird ein Lipidperoxyradikal gebildet (Reaktion 2), welches von einer benachbarten ungesättigten Fettsäure ein Wasserstoffatom abstrahieren

kann. Hieraus entsteht aus einem semistabilen Lipidhydroperoxid und einem neuen Lipidalkylradikal (Reaktion 3) eine Kettenreaktion, der Propagation-Kreislauf, welcher erst durch die Reaktion von radikalischen Zwischenstufen miteinander zum Erliegen kommt (Reaktion 4) (Younes, 2004).

Sauerstoffradikale und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) initiieren die Lipidperoxidation. Lipide, welche mehrere Doppelbindungen besitzen, wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Cholesterin, werden auf diese Weise oxidativ zerstört. Die Schädigung von Membranphospholipiden durch ROS führt zu Beeinträchtigungen der zellulären Funktionen, welche Zelllysis verursachen können (Younes, 2004).

1.6 COX-2 und der Arachidonsäuremetabolismus

Die Arachidonsäure (5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure) wird direkt über die Nahrung oder im Organismus aus der essentiellen ω -6-Fettsäure Linolsäure synthetisiert. Sie liegt in der Zellmembran als Ester in Phospholipiden vor und ist nur durch Freisetzung für weitere enzymatische Veränderungen verfügbar. Das Enzym Phospholipase A₂ setzt die Arachidonsäure frei, welche auf drei unterschiedlichen enzymatischen Wegen verstoffwechselt werden kann. Zu ihren Metaboliten zählen Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, welche aufgrund ihrer 20 Kohlenstoffatome auch als Eikosanoide bezeichnet werden (Eberhart und Dubois, 1995).

Der Cytochrom P450-Weg

Die freigesetzte Arachidonsäure wird mit P450 Enzymen über allylische Oxidation, Omega-Hydroxylierung, Epoxygenierung und die Neuordnung von Peroxiden zu Epoxy-eicosatriensäuren (EETs), Dihydroxyeicosatriensäuren (DHETs) und Hydroxy-eicosatetraensäuren (HETEs) umgewandelt (Capdevila et al., 1992), (Caro und Cederbaum, 2006).

Der Lipoxygenaseweg

Die Oxidation der Arachidonsäure wird durch Lipoxygenasen (LOX) an den Kohlenstoff-Positionen 5, 8, 12 und 15 katalysiert. Die primären Produkte sind 5S-, 8S-, 12S- oder 15S-Hydroperoxyeicosatetraensäure, welche durch Glutathionperoxidase zu 5-, 8-, 12-, oder 15-HETE reduziert werden können (Ding et al., 2003).

Der Cyclooxygenaseweg

Die Prostaglandinsynthese wird durch Cyclooxygenasen, die beiden Isoenzyme COX-1 und COX-2, katalysiert. Die Arachidonsäure wird dabei zu Prostaglandin G_2 umgewandelt, welches durch eine Peroxidasereaktion zu PGH_2 metabolisiert. Die Endprodukte der weiteren Verstoffwechselung von PGH_2 sind PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 und TXA_2 (Abb. 13) (Kam und See, 2000), (Ding et al., 2003).

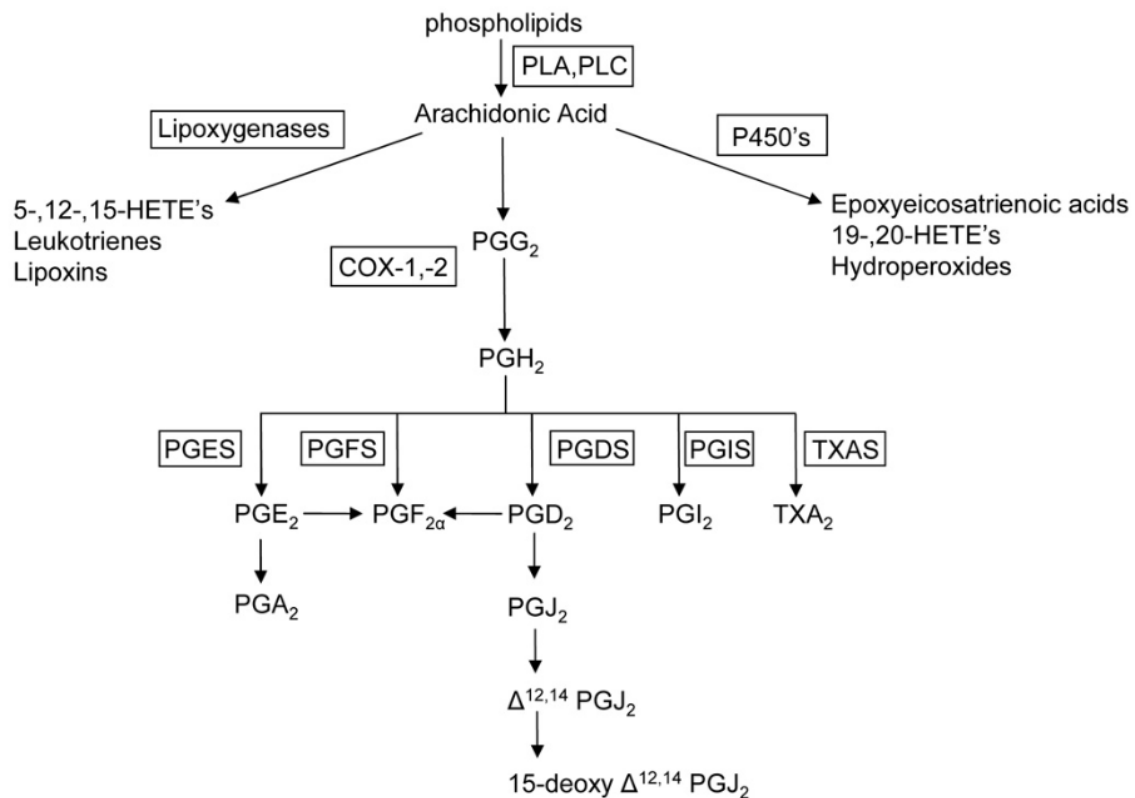


Abb. 13: Der Cyclooxygenaseweg des Arachidonsäuremetabolismus (Black et al., 2008).

COX-1 ist ein membrangebundenes Hämoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 71kDA und ist durch die Synthese von Prostaglandinen an physiologischen Prozessen beteiligt. Die vaskuläre Homöostase, Funktionen im Magen, die Aktivität der Blutplättchen und die Nierenfunktion werden über Prostaglandine durch COX-1-Aktivität geregelt. COX-1 liegt in stabilen Konzentrationen im endoplasmatischen Retikulum vor (Kam und See, 2000).

COX-2 besitzt ein Molekulargewicht von 70kDA und ist in geringen Mengen im Gehirn, den Nieren und im Uterus schwangerer Frauen nachweisbar. In entzündlichen Prozessen wird COX-2 über Wachstumsfaktoren, Cytokine, bakterielle Lipopolysaccharide oder Phorbol ester stimuliert und die Konzentration nimmt um das 10-80fache zu (Kam und See, 2000).

In der Kolonkarzinogenese spielt COX-2 eine wichtige Rolle in der Induktion der Tumorprogression, im Schutz vor Apoptose und der Produktion von Angiogenesefaktoren (Dimberg et al., 1999).

1.7 VEGF und seine Rolle in der Angiogenese

Die Angiogenese wird durch ein komplexes Kontrollsystem reguliert, dessen pro-angiogenetische und antiangiogenetische Faktoren, ein Gleichgewicht in der Bildung von Blutgefäßen gewährleisten. Unter normalen Bedingungen wird die Angiogenese während Wundheilung, Organregeneration und bei Frauen während der Ovulation, Menstruation und der Placentabildung eingeleitet. Die Bildung neuer Blutgefäße ist auch ein bedeutender Faktor in pathologischen Prozessen, wie dem Tumorwachstum. Einer der wichtigsten pro-angiogenetischen Faktoren ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Die VEGF Familie umfasst sieben verschiedene Glykoproteine (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und der plazentäre Wachstumsfaktor (PLGF). VEGF-A ist ein 34-42kDa homodimeres über Disulfidbrücken gebundenes Glykoprotein, welches über alternatives Spleißen sieben Isoformen bilden kann. Die Monomere bestehen aus 121, 145, 148, 165, 183, 189 oder 206 Aminosäuren (Hoeben et al., 2004). Zytokine, Wachstumsfaktoren und Gonadotropine regulieren auf indirektem Weg über VEGF Expression die Angiogenese. Faktoren welche die VEGF Expression erhöhen können sind FGF-4 (Deroanne et al., 1997), PDGF (Finkenzeller et al., 1997), TNF- α (Ryuto et al., 1996), TGF- β (Pertovaara et al., 1994), KGF (Frank et al., 1995), IGF-I (Goad et al., 1996), IL-1 β (Li et al., 1995) und IL-6 (Cohen et al., 1996). VEGF bindet an 3 Tyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden größtenteils in endothelialen Zellen exprimiert und induzieren Zellmigration, Zellproliferation (VEGFR-2) während VEGFR-3 in den Lymphgefäßen exprimiert wird (Neufeld et al., 1999).

Hypoxie induziert die Transkription von VEGF mRNA durch Bindung des HIF-1 am VEGF Promotor. Das Onkogen v-src kann die Expression von HIF-1 induzieren und damit die Expression von VEGF erhöhen (Neufeld et al., 1999).

Durch VEGF-Zugabe in das Zellmedium humaner endothelialer Zellen konnte eine 11.2fach höhere BCL-2 Expression erzielt werden. Stabile Transduktion von BCL-2 in Retrovirus-Vektoren zeigte eine hohe Abnahme der Apoptoserate, eine zweifach erhöhte Zellzahl und eine vierfache Erhöhung der Bildung kapillar-ähnlicher Gefäße (Nor et al., 1999).

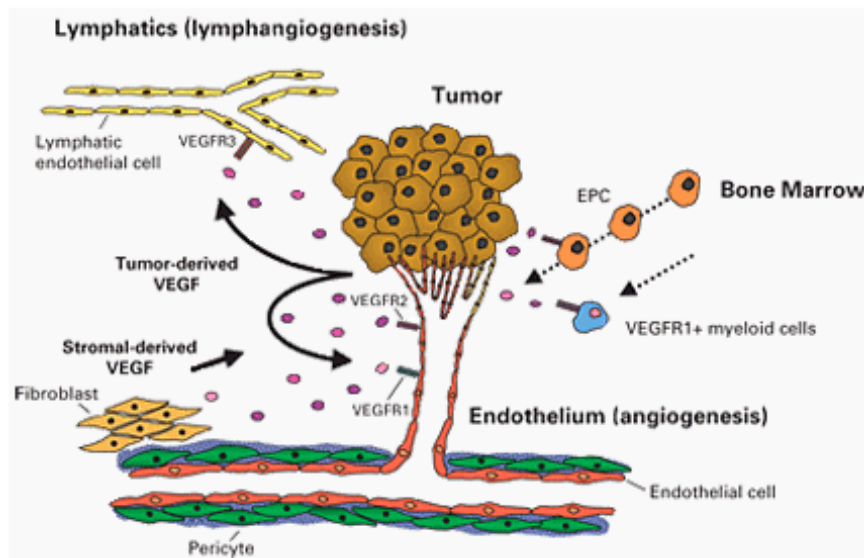


Abb. 14: Die Rolle des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors und dessen Rezeptoren in der Angiogenese (Hicklin und Ellis, 2005).

1.8 Oxidativer Stress und VEGF

Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von ROS (Reaktiver Sauerstoff Spezies) und dem Abbau dieser durch antioxidative Schutzmechanismen. Übersteigt die Bildung freier Radikale die antioxidative Kapazität der Zellen so kann es zu Veränderungen und Schädigungen der zellulären Proteine, Lipide und der DNA kommen. Akute und chronische Zellschädigungen, verursacht durch oxidativen Stress, sind an der Entstehung von Krebs maßgeblich beteiligt (Abb. 15). Akuter oxidativer Stress kann zu selektivem Zelltod und einer Zunahme der Zellproliferation durch Mutationen mit neu initiierten präneoplastischen Zellen führen. Chronischer oxidativer Stress führt zu einer Veränderung der normalen zellulären Wachstumskontrollmechanismen. Zellulärer oxidativer Stress kann die interzelluläre Kommunikation, die Protein Kinase Aktivität, die Membranstruktur und Funktion, die Genexpression und die Regulation des Zellwachstums verändern (Klaunig et al., 1998).

ROS fällt in aeroben Organismen als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmung in Form von Superoxidradikal $\cdot\text{O}_2^-$ und Hydrogenperoxid H_2O_2 an. In Neutrophilen wird über das Enzym Myeloperoxidase HOCl erzeugt, welches durch Oxidation als freies Radikal Schädigungen der Lipide und Proteine erzeugt (Halliwell und Aruoma, 1991), (Pitt und Spickett, 2008).

Das hochreaktive H_2O_2 , welches über die Oxidation von $\cdot\text{O}_2^-$ entsteht, reagiert mit reduzierten Metallionen (Fe^{2+} , Cu^+) zu einem Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}$ (Fenton-Reaktion), welches zu DNA-Schädigung führen kann (Halliwell und Aruoma, 1991).

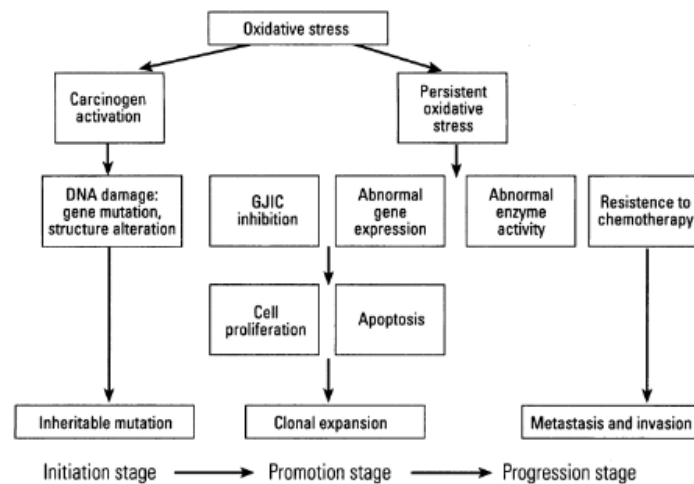


Abb. 15: Oxidativer Stress in akuter und chronischer Ausprägung im Zusammenhang mit Initiation, Promotion und Progression (Klaunig et al., 1998).

Während chronischer Entzündungsvorgänge wurde eine Zunahme der freien Radikale und DNA-reaktiver Aldehyde von Lipidperoxidationen festgestellt, welche die zelluläre Homöostase und die Veränderung von normalen zu malignen Zellen fördern (Bartsch und Nair, 2004). Diese Veränderung von benignem zu malignem Gewebe ist durch selektive Wachstumsstimulation und die Expression von tumorfördernden Genen in prämaligen Zellen zurückzuführen. Die Wachstumsstimulation von kolorektalen Adenomen wird durch eine erhöhte VEGF-Expression hervorgerufen, welche ebenfalls die Bildung neuer Blutgefäße induziert. Fettsäurehydroperoxide entstehen durch die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei der Essensverarbeitung mittels hoher Temperaturen. Durch Linol-säurehydroperoxid (LOOH)-Behandlung einer Adenom- (LT97) und einer Karzinomzelllinie (SW480) konnte die intrazelluläre Hydrogenperoxidkonzentration erhöht werden und zeigte eine Hochregulation der VEGF mRNA. Ebenfalls konnte eine erhöhte Expression von COX-2 verzeichnet werden, welches für die Prostaglandinsynthese verantwortlich ist. Somit konnte festgestellt werden, dass Fettsäurehydroperoxide maßgeblich an der Wachstumsinduktion adenomatöser Polypen und ihrer Entartung in Karzinome beteiligt sind (Jurek et al., 2005).

1.9 Zelluläre Schutzmechanismen

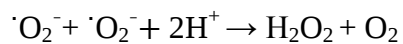
1.9.1 Mechanismen gegen freie Radikale

Lebende Zellen besitzen enzymatische und nicht-enzymatische Schutzsysteme, welche freie Radikale inaktivieren, Oxidationen unterbinden und Schädigungen reparieren (Younes, 2004).

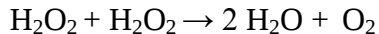
Enzymatische Schutzsysteme:

Zu den enzymatischen Schutzsystemen zählen Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase.

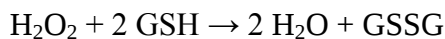
Die Superoxiddismutase katalysiert die Disproportionierung von Superoxidionen. Da dieses Enzym in hohen Konzentrationen in allen Geweben vorkommt, ist eine effiziente Schutzfunktion vor Superoxidradikalen gewährleistet. In Eukaryonten kommt die Superoxiddismutase im Zytosol als kupfer- und zinkhaltige Form und in den Mitochondrien als manganhaltige Form vor. Die Superoxidradikalanionen werden zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutiert:



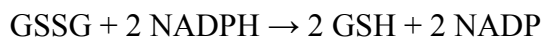
Hydrogenperoxid stellt im Organismus ein hochreaktives Molekül dar und ist in der Lage mit reduzierten Metallionen Hydroxylradikale zu bilden. Um dies zu verhindern, entgiftet die Katalase, ein tetrameres Hämprotein, die Zellen durch Disproportionierung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff:



Die zytosolische Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid mittels des Tripeptids Glutathion zu Wasser und Glutathiondisulfid.



Durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase kann das gebildete Glutathiondisulfid zurückreduziert werden:



So steht wieder GSH zur Verfügung um die Schutzfunktion der Glutathionperoxidase, welche auch für die Reduktion von Hydroperoxiden in Membranphospholipiden verantwortlich ist, aufrechtzuerhalten (Younes, 2004).

Nicht-enzymatische Schutzsysteme:

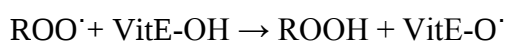
Zu den nicht-enzymatischen Schutzsystemen zählen Antioxidantien, wie Vitamin E, C, β -Carotin und das im Körper synthetisierte Glutathion.

Vitamin E ist ein membranlösliches Antioxidans, dessen unterschiedliche Methylierung des Chromanolringes vier unterschiedliche Formen hervorbringt: α -, β -, γ - und δ -Tocopherol. Alle vier Formen bestehen aus einem 6-Chromanolring und einer lipophilen Seitenkette.

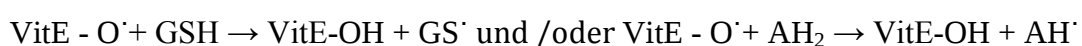
Tocopherole werden über die Nahrung aufgenommen, in Form von pflanzlichen Ölen (Weizenkeim-, Soja-, Erdnuss- und Palmöl), Nüssen (Wal-, Pekan- und Erdnüsse), Getreide und Samen. α - und γ -Tocopherol weisen hohe antioxidative Schutzwirkungen auf. α -Tocopherol wird im Organismus im Plasma, den Erythrozyten und der Leber vorgefunden. Es wird nach der Nahrungsaufnahme im Dünndarm absorbiert, in Chylomikrons sekretiert und von der Leber aufgenommen. In der Leber wird es in Form des very low-density Lipoproteins (VLDL) in das Blutgefäßsystem sekretiert um anschließend ins Gewebe transportiert zu werden. Das α -Tocopherol Transport Protein transferiert α -Tocopherol, jedoch nicht γ -Tocopherol in VLDL. Aus diesem Grund ergibt sich eine höhere α -Tocopherol-Konzentration im Plasma und eine daraus folgende höhere Bioaktivität. γ -Tocopherol wird von der Leber durch den Gallensaft in den Verdauungstrakt sekretiert (Campbell et al., 2003), (Stone und Papas, 1997).

Wenngleich γ -Tocopherol eine geringere Bioverfügbarkeit als α -Tocopherol im Organismus aufweist, so besitzt es ebenfalls sehr wichtige antioxidative und antientzündliche Wirkungen auf zellulärer Ebene und greift somit auch in die Prävention der Kolonkarzinogenese ein (Yang et al., 2010). γ -Tocopherol detoxifiziert Peroxynitrit, ein potentiell Mutagen welches in der Kolonkarzinogenese mitwirkt. Durch Nitration entsteht das unschädliche 5-nitro- γ -Tocopherol. Peroxynitrit entsteht während Entzündungsprozessen und erhöht somit das Risiko für Kolonkarzinome (Campbell et al., 2003).

Tocopherole besitzen ebenfalls eine antioxidative Schutzwirkung in Bezug auf die Inaktivierung freier Radikale. In peroxidierenden Membranphospholipiden werden Peroxyl- und Alkoxyradikale gebildet, diese reagieren mit der Chromanolgruppe der Tocopherole. Durch diese Reaktion werden die Radikale abgefangen und ihre peroxidative Kettenreaktion abgebrochen (Younes, 2004).



Um die aktive Form der Tocopherole wiederherzustellen muss das Vitamin E- Radikal durch Glutathion und/oder Ascorbinsäure (Vitamin C) reduziert werden (Younes, 2004):



2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Krebserkrankungen können durch ererbte Mutationen entstehen, sind jedoch in 70-90% der Fälle auf exogene Ursachen zurückzuführen. Eine erhöhte Fett- und Fleischaufnahme ist mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies verbunden und erhöht dabei das Risiko der Ausbildung kolorektaler Karzinome.

In dieser Diplomarbeit wurde der Hauptfokus auf die Entstehung freier Radikale und die enzymatischen und nicht-enzymatischen Schutzmechanismen gelegt. Signaltransduktionswege, welche für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen verantwortlich sind, wurden auf ihre Zusammenhänge und Wechselwirkungen im Zusammenspiel mit Fettsäurehydroperoxiden untersucht.

Im Speziellen sollten folgende Themen untersucht werden:

- Die antioxidativen Schutzwirkungen von α - und γ -Tocopherol auf die intrazelluläre H_2O_2 -Bildung, ausgelöst durch Lipidperoxide.
- Die prooxidative Wirkung von Hämatin-Eisen auf die Lipidperoxidation und die damit einhergehende Bildung freier Radikale. α - und γ -Tocopherol wurden eingesetzt um ihre Schutzmechanismen gegenüber Hämatin auf die H_2O_2 -Bildung zu erforschen.
- Der Einfluss von α - und γ -Tocopherol auf die Genexpression von VEGF und COX-2, welche durch Lipidperoxidationen beeinflusst werden.
- Dies wurde auch auf Protein-Ebene untersucht. COX-2, welcher als Katalysator der Prostaglandin-Synthese gilt, wurde über den Prostaglandin-Assay untersucht.
- Die enzymatischen Schutzsysteme wie Katalase und Superoxiddismutase wurden mit Einwirkung von LOOH und der unterstützenden Schutzwirkung der Tocopherole überprüft.
- Der Transkriptionsfaktor NF- κ B welcher in Entzündungsprozessen wirkt und über COX-2 Aktivierung die Prostaglandinsynthese aktiviert, wurde durch LOOH-Behandlung und die schützenden Vitamine α - und γ -Tocopherol untersucht.

- Die Versuche wurden mit der Karzinomzelllinie HT29 und den Adenomzelllinien LT97-2 und LT97-3 durchgeführt. Dies war von besonderer Wichtigkeit, um in den jeweiligen Versuchen ebenfalls die Unterschiede zwischen Adenomen und Karzinomen zu erforschen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Material für die Zellkultur

Zellkulturschalen: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Petrischalen (PDs): 6cm und 10cm Durchmesser

24-Well- und 6-Wellplatten

MEM (Minimum Essential Medium): Sigma, St. Louis, MO, USA

Inhaltsstoffe sind 0,3g/L L-Glutamin; 0,1g/L L-Arginin; 1g/L D-Glukose und 6g/L Hepes. Dem Grundmedium werden 2g/L NaHCO₃ zugefügt.

FCS (fötales Kälberserum): PAA, Pasching, Austria

Penicillin/Streptomycin: PAA, Pasching, Austria

10% FCS in MEM (Zuchtmedium für Karzinomzellen):

Zugegeben werden 50ml FCS und 2ml Penicillin/Streptomycin.

Für serumfreies Medium wird FCS weggelassen.

Zur Zellbehandlung wird 1%BSA zugefügt.

HAM 's Medium (Zuchtmedium für Adenomzellen): Sigma, St. Louis, MO, USA

Zu 400ml Medium (LT-full-Medium) werden zugegeben:

8ml FCS (PAA, Pasching, Austria)

1,6ml Penicillin/Streptomycin: 10000U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin (PAA)

0,8ml Insulin 10µg/ml (Sigma, USA)

1,6ml V10 1µg/ml (Sigma, USA)

0,4ml EGF: Epidermal Growth Factor 30ng/ml (Preprotech, London, UK)

0,8ml Gentamycin 10mg/ml (Biochrom AG)

Für das Behandlungsmedium (LT-basic-Medium) wird EGF und Insulin weggelassen.

PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline): Sigma, St. Louis, MO, USA

Bestehend aus 8g/L NaCl; 1,15g/L NaCl; 0,2g/L KCL; 0,2g/L KH_2PO_4 (Sigma).

PBS/EDTA:

Verwendet für das Waschen der Karzinomzellen und Ablösen der Adenomzellen.

10mM Ethylendiamintetraessigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in PBS.

Trypsin/EDTA: PAA, Pasching, Austria

Trypsin-Stock (0,5g/L Trypsin und 0,2g/L EDTA in Wasser) 1:10 in PBS (steril) verdünnen.

10%BSA: Sigma, St. Louis, MO, USA

1g BSA in 10ml serumfreien MEM lösen und steril filtrieren.

3.1.2 Zelllinien

HT29: Es handelt sich um eine Adenokarzinomzelllinie, welche von Dr. E. Friedman bereitgestellt wurde (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center). Diese Zellen verdoppeln sich in ca. 24h und formen Mikrofilamente und Mikrovilli aus. HT29 Zellen sind adhärent, wachsen in einer Monolage und werden in MEM+10% FCS kultiviert.

LT97: Diese humane Kolon-Mikroadenomzelllinie wurde von M. Richter et al., 2002 charakterisiert. Die Zellen wurden aus einem Mikroadenomrasen eines Polyposis Patienten entnommen. Sie weisen eine Ki-ras Mutation auf und haben beide Allele des APC Tumorsuppressorgens verloren (Richter et al., 2002).

Diese Zelllinie wächst in dreidimensionalen, plateauförmigen Kolonien und muss in Form von Zellaggregaten mit PBS/EDTA anstelle von Trypsin passagiert werden, da sie einzeln nicht überlebensfähig sind.

LT97-2: Diese Zellen wurden von Inga Koneczny aus der LT97-1-Zelllinie entwickelt. Sie besitzen eine Verdoppelungszeit von 72-96 Stunden und brauchen ungefähr 48h um sich anzuheften. Im Laufe der Zeit konnte beobachtet werden, dass sich die Zellteilungsrate erhöhte und nur noch 24 Stunden zur Anheftung benötigt wurden.

Passagiert werden die Zellen 1:2 höchstens 1:3, da Vereinzeln der Zellen Wachstum und Viabilität verändert. Eine Dichte von 90-100% ist jedoch letal für diese Zelllinie.

Die 3D Plateaus zeigen nicht mehr die röhrenförmige Struktur der LT-1, sondern besitzen anstelle dieser rundliche Gebilde. Die CD44 Oberflächenmarker-Expression ist zwischen 10% und 70% (Inga Koneczny, 2009).

LT97-3: Diese Zelllinie entwickelte sich aus einer späten Passage der LT97-2. Die Verdoppelungszeit liegt bei 48-72 Stunden und die Anheftungsdauer beträgt 24 Stunden. Nach einiger Zeit der Zellen in Kultur konnte beobachtet werden, dass die Verdoppelungszeit abnahm, die Anheftungszeit jedoch gleich blieb. Passagiert werden diese Zellen 1:5. Sie sind 90-100% CD44 positiv und zeigen ein verändertes Genexpressionsprofil (Inga Koneczny, 2009).

3.1.3 Passagieren der Zelllinien

Die Zellen brauchen Standardbedingungen um zu wachsen, dies erfolgt bei 95%O₂, 5%CO₂ und 37°C. Bei 80%-90% Konfluenz werden die Zellen gesplittet. Das Nährmedium wird entfernt, die Zellen werden mit 10mM PBS/EDTA gewaschen und mit Trypsin/EDTA in PBS von der Zellkulturschale gelöst. Die Zelllinien LT97-2 und LT97-3 wurden mit PBS/EDTA abgelöst. Die Behandlung mit Trypsin bzw. PBS/EDTA erfolgt für 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Um die Ablösung der LT-Zelllinien zu beschleunigen, muss während der EDTA-Einwirkung oftmals auf die Petrischale geklopft werden.

Das Abstoppen der Loslösung wird mittels Zugabe des Mediums durchgeführt.

3.1.4 Testsubstanzen

- α -Tocopherol(Sigma-Aldrich)
- γ -Tocopherol(Sigma-Aldrich)
- Hämatin
- Linolsäure Hydroperoxid (LOOH)

LOOH wurde an der Veterinärmedizinischen Universität Wien hergestellt und von Herrn Prof. Stolze zur Verfügung gestellt.

3.2 Neutralrottest zur Zellzahlbestimmung

Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Diffusion des Farbstoffes Neutralrot in die Lysosomen lebender Zellen. Um die Anzahl vitaler Zellen zu ermitteln, wird bei diesem Assay der Farbstoff in serumfreien MEM für 1h im Wasserbad gelöst und anschließend filtriert. Von den Zellen wird das Behandlungsmedium abgesaugt und sie werden für 2h mit der Neutralrotlösung im Brutschrank inkubiert. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen wird mit 1×PBS gewaschen und mit Neutralrot-fix, bestehend aus 1%Essigsäure in 70%Ethanol, fixiert. Bei diesem letzten Schritt wird bei einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten die Färbelösung aus den Lysosomen der Zellen herausgelöst. Je 100µl werden in eine 96-Wellplatte pipettiert um anschließend die Absorption, bei einer Wellenlänge von 562nm und 620nm als Referenz, gegen einen Blindwert photometrisch zu messen.

3.3 FACS-Analyse

Der fluoreszenzaktivierte Zellsortierer (FACS) wird eingesetzt um eine spezifische Zellart aus einer gemischten Zellsuspension auszuwählen und um gleichzeitig auf Gestalt und Größe der Zellen zu schließen. Die Zellen werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert und anschließend an einem Laserstrahl vorbeigeführt um das emittierende Fluoreszenzlicht zu messen. Granularität und Größe werden anhand der Lichtstreuung gemessen. Die Größe wird durch das Vorwärtsstreulicht (FSC=Forward Scatter) ermittelt, während die Granularität der Zellen durch das im 90° Winkel abgelenkte Seitwärtsstreulicht (SSC=Sideward Scatter) gemessen wird. Nach der Ermittlung des Zellstatus bilden sich einzelne Tröpfchen mit einer bestimmten elektrischen Ladung, welche proportional zur Fluoreszenzintensität ist. Um die Zellen zu sortieren, werden die Tröpfchen in einem elektrischen Feld verschieden abgelenkt und gesammelt (Lodish et al., 2000).

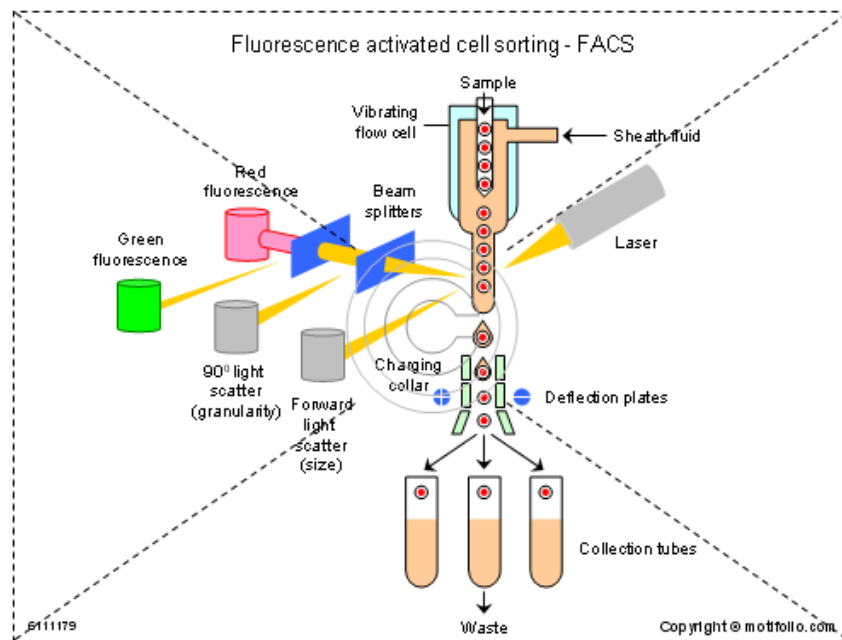


Abb. 16: Das Prinzip des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (www.motifolio.com/6111179.html).

3.3.1 Dichlorofluorescein-FACS

Mittels dieser Methode kann der Peroxidgehalt innerhalb der Zelle ermittelt werden. Das 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetat (Sigma) diffundiert durch die Zellmembran und wird dort von Esterasen zum nicht fluoreszierenden Dichlorodihydrofluorescein hydrolysiert. Dieses reagiert mit Peroxiden und wird zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein oxidiert. Die Messung erfolgt mittels eines FACS Gerätes bei einer Anregungswellenlänge von 505nm und der DCF-Emission bei 535nm.

Versuchsdurchführung:

Die in Petrischalen kultivierten Zellen werden gewaschen, abtrypsinisiert und mit 10%FCS-MEM für Karzinomzelllinien, beziehungsweise LT-full-Medium für Adenomzelllinien, abgestoppt. Anschließend werden die Zellen in Falcons bei Raumtemperatur bei 1200rpm 5 Minuten abzentrifugiert und in HBSS (Sigma) mit 1%FCS aufgenommen. Die Zellsuspension wird verdünnt, sodass pro Probe 1×10^6 Zellen/500µl HBSS in ein FACS-Röhrchen transferiert werden. Die Testsubstanz wird gleichzeitig mit 25µM 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetat zu jeder Probe zugegeben. Bei leicht geöffnetem Deckel werden die Röhrchen für 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für die Positivkontrolle wird 15 Minuten vor Inkubationsende 1mM Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Messung erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 505nm und einer Emission des DCF bei 535nm mittels eines FACSCalibur Gerätes (Beckton & Dickinson, Sunnyvale, CA, USA).

3.4 Analyse auf RNA Ebene

3.4.1 RNA-Isolation aus Zellkulturzellen

Die RNA-Isolation wird mit peqGOLD TriFastTM (PeqLab, Erlangen, D) durchgeführt. Die darin enthaltenen Bestandteile, Guanidinisothiocyanat und Phenol, sichern die Integrität der RNA, während der Rest der Zelle lysiert wird.

Während des Vorgangs der Isolation ist es wichtig möglichst RNase frei zu arbeiten, um die Reinheit der RNA zu gewährleisten. Daher werden die Schaber 10 Minuten in 0,1N NaOH in DEPC (Diethylpyrocarbonat) und anschließend 10 Minuten in 70% EtOH in DEPC inkubiert, danach gut abgespült und 5 Minuten in der Werkbank getrocknet.

Das Nährmedium der Zellen wird abgesaugt, TriFAST aufgebracht und 5 min auf Eis stehen gelassen. Die weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt um die instabile RNA vor Zerfall zu schützen. Die Zellen werden abgeschabt, in einer Spritze aufgezogen, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und dort durch mehrmaliges aufziehen und ausstoßen homogenisiert. Um alle lipophilen Verunreinigungen abzutrennen wird Chloroform zugegeben, 30 sek gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird bei 4°C bei 15000rpm 15min abzentrifugiert um eine Phasenauftrennung zu erreichen. Die entstehenden 3 Phasen beinhalten die obere wässrige Phase mit der RNA, die Interphase welche die DNA enthält und die untere organische Phase mit Proteinen. Ausschließlich die obere Phase wird vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit Isopropanol die RNA gefällt. Nach der Zugabe des Isopropanols wird 30 sek gevortext, 10 min auf Eis stehen gelassen und bei 4°C und 12000rpm 10min abzentrifugiert.

Das entstandene Pellet wird mit 70% EtOH in DEPC gewaschen und bei 4°C und 15000rpm 15min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in der Werkbank getrocknet und je nach Größe des Pellets in geeigneter Menge zwischen 10 und 50µl DEPC aufgenommen. Die fertig isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

Die RNA Konzentration wurde mittels eines NanoDropTM Spectrophotometers (PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) in ng/µl quantifiziert und mit einer ND 1000 Software bearbeitet. Die Reinheit sollte bei einem Wert zwischen 1,7 -2,2 liegen.

Tab. 1: Mengenangaben der verwendeten Reagenzien

	TriFAST	Chloroform	Isopropanol
Petrischale 6cm	500µl	100µl	250µl
Petrischale 10cm	1000µl	200µl	500µl

3.4.2 cDNA-Synthese:

Um Genexpressionen mittels PCR zu ermitteln, muss die RNA zuvor in einem PCR-Cycler in cDNA umgeschrieben werden. Alle Reagenzien werden auf Eis gelagert und es wird auf Eis sauber mit Handschuhen gearbeitet. Es werden 5µg RNA in cDNA umgeschrieben, diese werden in einem sterilen PCR-Tube auf 10µl mit DEPC aufgefüllt. Pro Probe werden 2,5µl Random Hexamer Primer Master Mix, bestehend aus 1µl Hexa-Primer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) und 1,5µl DEPC, zugefügt. Im Thermocycler werden die Proben zur Denaturierung 5 min auf 70°C erhitzt und danach auf 4°C abgekühlt. Ein Mastermix bestehend aus 4µl 5× first strand buffer (MMuV-buffer, Fermentas, Burlington, Canada), 2µl dNTP-Mix (10µl von jedem Nukleotid in 60µl DEPC-Wasser; Roche, Basel, Schweiz) und 0,5µl (=20 Units) RNase Inhibitor (20 Units; Fermentas, Burlington, Canada) wird vorbereitet, gut durchmischt mit jeder Probe und 5 min auf 25°C erhitzt. 1µl Reverse Transkriptase (200u/µl; RevertAidTM MMuV reverse transcriptase; Fermentas, Burlington, Canada) wird zugegeben und der DNA-Aufbau findet bei 42°C und einer Inkubationszeit von 1h statt.

Das Abstoppen der Reaktion wird durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase durchgeführt, welche für 10min auf 70°C erhitzt wird. Die cDNA wird auf Eis gestellt, mit 80µl DEPC-Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.4.3 Real-time PCR

Die Real-time PCR zeichnet sich dadurch aus, dass bei jedem Zyklus die aktuelle vorhandene DNA-Menge gemessen wird und somit die Amplifikation in „real time“ beobachtet werden kann. Es wird eine besonders genaue, schnelle Messung und vor allem eine Quantifizierung des gesuchten Gens möglich.

Die Messung findet in einem Thermocycler mit Fluoreszenz-Detektor (ABI Prism 7000 Sequence Detection System) statt.

Das Prinzip dieser PCR besteht darin, dass zusätzlich zu den Primern eine fluoreszenz-markierte Sonde hinzugefügt wird. Diese spezielle Sonde bindet an eine Gensequenz

zwischen den Primern und ist mit einem Reporterfarbstoff und einem Quencherfarbstoff markiert. Bei der DNA-Synthese hydrolisiert die Taq-Polymerase die Taqman Sonde, indem sie durch ihre 5' Nuklease Aktivität den Reporterfarbstoff vom Quencher entfernt. Da die Energie des Reporters nicht mehr vom Quencher unterdrückt wird, kann man die entstehende Fluoreszenz, welche proportional der gebildeten DNA Menge ist, messen.

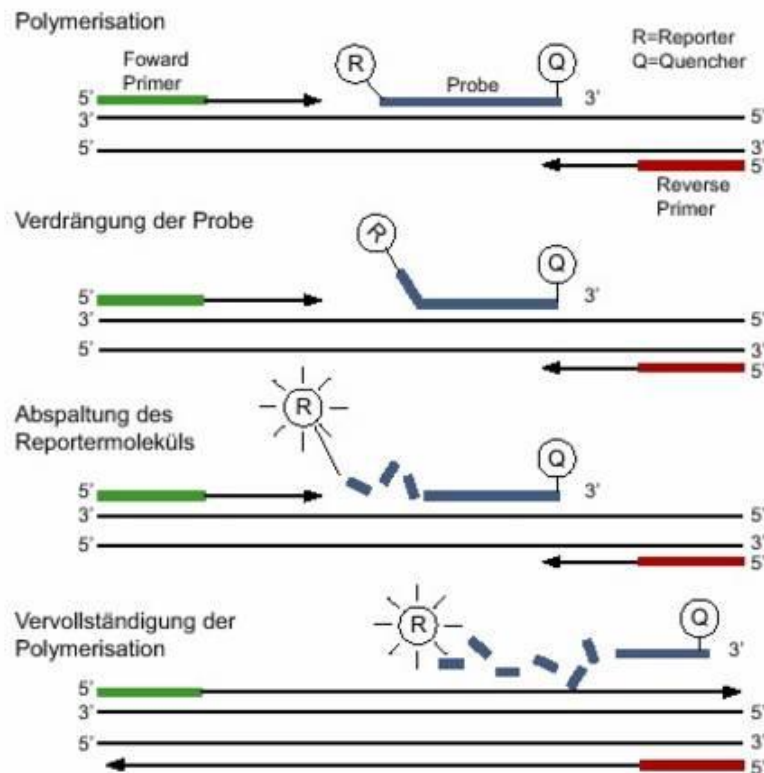


Abb. 17: Prinzip der Real-Time PCR (www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001).

Versuchsaufbau:

Die Expression der Gene aus Tab. 2 wurde mittels der Real Time PCR Technik nachgewiesen. Es wurde der Taqman Genexpressionsassay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet.

Die Mastermixe werden wie folgt gemischt:

- Probenmix: 1µl cDNA und 8µl DEPC
- Sondenmix: 1µl Taqman-Probe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und 10µl 2×TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)

Für Halbansätze wurde die Hälfte der Volumina verwendet.

Tab. 2 :Liste der Taqman-Proben.

Hersteller	Gen	Reporter	Produktnummer
Taqman	GAPDH	FAM	Hs99999905_m1
Taqman	COX-2	FAM	Hs00153133_m1
Taqman	VEGF	FAM	Hs00173626_m10

In Doppelbestimmung werden 9µl des Probenmix und 11µl der entsprechenden Sonde in eine 96-Wellplatte (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pipettiert. Die Platte wird mit einem Klebestreifen verschlossen und bei Raumtemperatur und 1500rpm 5min abzentrifugiert.

Für die anschließende DNA-Messung wird ein ABI Prism 7000 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet.

Die PCR Ergebnisse werden mit einer ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und der ΔC_t -Methode ausgewertet. Der Zyklus bei dem der Schwellenwert in der exponentiellen Phase überschritten wird, gibt den Ct Wert an. Der ΔC_t -Wert bezeichnet die Differenz der Ct-Werte zwischen Zielgen und Referenzgen (GAPDH) bei gleicher DNA Menge. Zuletzt wird der $2^{-\Delta C_t}$ ermittelt, welcher die relative Menge an DNA, verglichen zu einem Kontrollwert und normalisiert auf ein Referenzgen, angibt.

3.5 Untersuchung der Schutzmechanismen

3.5.1 Superoxiddismutase Activity Assay Kit (BioVision)

Superoxiddismutase ist eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme. Es katalysiert die Disproportionierung eines Superoxid-anions in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff. Der hochsensitive SOD Assay Kit verwendet WST-1, (Water Soluble Tetrazolium), welches über die Reduktion mit einem Superoxid-anion die wasserlösliche Formazan Färbung produziert. Diese Reduzierung mit dem Superoxid-anion ist linear gekoppelt mit der Xanthin Oxidase Aktivität und wird von SOD inhibiert. Mittels eines Spectrophotometers kann die Hemmungsrate von SOD gemessen werden (BioVision).

Tab. 3 :Volumina der Arbeitslösungen für die Proben und Leerwerte.

	Probe	Blank 1	Blank2	Blank3
Probenlösung	20µl		20µl	
ddH ₂ O		20µl		20µl
WST Arbeits- lösung	200µl	200µl	200µl	200µl
Enzym Arbeits- lösung	20µl	20µl		
Lösungspuffer			20µl	20µl

Versuchsdurchführung:

Die Zellen werden mit einem Lysispuffer, bestehend aus 0,1M Tris/HCL pH 7,4; 0,5% Triton X-100; 5mM β-ME und 0,1mg/ml PMSF, homogenisiert. Das Zelllysate wird bei 4°C und 14000rpm 5min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser enthält zytosolische und mitochondriale SOD Aktivität.

Bevor die Proben und Lösungen auf eine 96-Wellplatte aufgetragen werden, müssen die Arbeitsreagenzien in geeigneten Volumina wie folgt gemischt werden:

- WST Arbeitslösung: 1ml dieser Lösung wird in 19 ml Assay Puffer verdünnt.
- Enzym Arbeitslösung: Diese Lösung wird für 5 Sekunden abzentrifugiert und anschließend gut durchmischt. 15µl werden in 2,5ml Lösungspuffer verdünnt.

Für jede Probe werden 3 Blanks ermittelt, mit welchen durch eine Kalkulationsformel auf die SOD Aktivität geschlossen werden kann.

Die Proben und Arbeitslösungen werden mit geeigneten Volumina (Tab. 3) in die 96-Wellplatte pipettiert. Zuerst werden die Proben und das doppelt destillierte Wasser aufgetragen. Die WST Arbeitslösung wird in jedes Well zugegeben und der Lösungspuffer zu den entsprechenden Blank-wells pipettiert. Nach Zugabe der Enzym Arbeitslösung wird die Platte für 20min bei 37°C inkubiert. Mittels eines Mikroplattenlesers wird die Absorption bei 450nm gemessen und durch folgende Formel die SOD Aktivität ermittelt:

$$\text{Sod Aktivität (Hemmungsrate in \%)} = \frac{(A \text{ blank1} - A \text{ blank3}) - (A \text{ Probe} - A \text{ blank2})}{(A \text{ blank1} - A \text{ blank3})} \times 100$$

3.5.2 Katalase Assay Kit (BioVision)

Katalase ist ein wichtiges antioxidatives Enzym, welches in beinahe jedem Organismus gebildet wird. Es katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.

Der Test-Kit bietet eine hoch sensitive, einfache und direkte Messung der Katalaseaktivität in biologischen Proben. Zuerst reagiert die Katalase mit H_2O_2 um Wasser und Sauerstoff zu bilden. Das nicht umgewandelte H_2O_2 produziert gemeinsam mit der OxiRed™ Probe ein Produkt, welches bei 570nm gemessen werden kann. Die Katalase Aktivität ist umgekehrt proportional zu diesem Signal und kann in Picogramm detektiert werden.

Bevor die Katalase Reaktion durchgeführt wird, müssen einige Reagenzien wie folgt gelöst werden.

- OxiRed™ Probe: Jedes Röhrchen wird mit 110µl DMSO gelöst und auf ungefähr 18°C erwärmt um in flüssigen Zustand zu gelangen.
- HRP Lösung: Diese wird mit 220µl Assay Puffer gelöst.
- Lösung für Positivkontrolle: Das Röhrchen wird mit 500µl Assay Puffer gelöst und aliquotiert.

Probenherstellung:

Die Zellen werden auf Eis mit 200µl kaltem Assay Puffer homogenisiert und anschließend bei 4°C und 10000rpm 15min abzentrifugiert. Der Überstand welcher die Katalase enthält wird abgenommen und in Eppendorfgefäßen auf -80°C gelagert.

H_2O_2 - Standardkurve:

Die Standardkurve ist notwendig um die nmol H_2O_2 zu berechnen, welche von der Katalase in 30 Minuten umgewandelt werden.

20mM H_2O_2 werden durch Lösung von 5µl 0.88M H_2O_2 in 215µl DiH_2O erreicht. Von den 20mM werden 50µl entnommen und in 950µl DiH_2O verdünnt um auf 1mM H_2O_2 als Endkonzentration zu gelangen. Es wird eine Standardreihe von 0,1,2,3,4,5 nmol/Well in eine 96-Wellplatte pipettiert und mit Assay Puffer zu einem Volumen von 45µl gebracht. Zum Schluss werden 10µl Stoplösung zugefügt.

Vorbereitung der Proben und Positivkontrolle:

Es werden Probenmengen von 1-39µl genommen und mit Assaypuffer auf 39µl verdünnt. Von der Positivkontrolllösung werden 1µl und 5µl ebenfalls mit Assaypuffer auf das gleiche Endvolumen verdünnt. Zusätzlich zu den Proben werden sogenannte High Controls vorbereitet und gemessen. Diese beinhalten die gleiche Menge an Probe und Assaypuffer, jedoch wird im Gegensatz zu den normalen Proben gleich anschließend 10µl Stopplösung hinzugefügt. Es wird für 5min bei 25°C inkubiert um die Katalaseaktivität zu hemmen.

Katalasereaktion:

Zu jeder Probe und den zugehörigen High Controls werden 3µl 1mM H₂O₂ zugegeben und für 30 min bei 25°C inkubiert. Um die Katalaseaktivität zu stoppen werden 2,5µl Stopplösung hinzugefügt.

Bevor die Proben im Platerader gemessen werden können, muss ein Developmix vorbereitet werden.

In jedes Probe-, High Control- und Standardwell werden 12,5µl Developmix hinzugefügt.

- 11,5µl Assaypuffer
- 0,5µl OxiRed™ Probe
- 0,5µl HRP-Lösung

Bei 25°C wird für 10min inkubiert und bei 570nm gemessen.

Berechnung:

Um Ungenauigkeiten bei Signaländerungen seitens der Katalase zu umgehen, wird ΔA aus $A_{HC} - A_{sample}$ berechnet. ΔA wird als y in die Geradengleichung der Standardkurve eingesetzt um auf B zu kommen. B ist die Menge an zersetzten H₂O₂ durch 30min Katalaseaktivität.

Die Katalase Aktivität berechnet sich aus:

$$\text{Kat Aktivität} = \frac{B}{30 \times V} \times \text{Probenlösungsfaktor} = \text{nmol/min/ml}$$

B....ist die aufgespaltete H₂O₂ Menge in nmol

V....ist das ursprüngliche in die Reaktion eingesetzte Probenvolumen (in ml)

30....ist die Reaktionszeit (Katalaseaktivität)

3.6 Lipofektion

Bei dieser Transfektionsmethode werden Plasmide, welche das zu untersuchende Fremdgen enthalten, mit Liposomen gemischt um diesen Komplex in eukaryotische Zellen einzufügen.

Es wurde das Fettsäurereagenz TransFectin™ mit den Plasmiden zusammengebracht, um anschließend den Lipid-DNA-Komplex auf die Zellen zu bringen. Transfectin ist ein Detergens mit positiv geladenen Kopfgruppen. Dadurch reichert sich der Komplex an der negativ geladenen Oberfläche der Zellen an, um eine Verschmelzung der Zellmembran mit der Liposomenhülle zu erreichen. Das Plasmid wird in den intrazellulären Raum freigegeben und nach 1-2 Tagen kann, mittels Luciferase Assay, das exprimierte Protein nachgewiesen werden.

In 24 Wellplatten werden 5×10^4 Zellen angesetzt. Drei Tage später erfolgt die 24 stündige Behandlung mit 50 μM α und γ -Tocopherol. Für jedes Well wird 1 μg Plasmid DNA mit 50 μl serumfreien Medium vorbereitet. Von der Transfektionslösung werden 2 μl in 50 μl serumfreien Medium pro Well verdünnt. Anschließend wird die DNA und Transfectinlösung durch vorsichtiges Pipettieren vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 μl der Mischung wird in jedes Well zu den Zellen gefügt und langsam geschwenkt um die Lösung auf den Zellen gleichmäßig zu verteilen. Nach 6 Stunden wurde ein Medienwechsel für alle Wells und für einige mit Zugabe von 20 μM LOOH durchgeführt und für 24h inkubiert.

3.7 Dual Luciferase Assay

3.7.1 Dual Luciferase Reporter 1000 Assay

Transkriptionsfaktoren regulieren, indem sie an die TATA-Box des Promotors binden, die Genexpression in eukaryotischen Zellen. Um die Aktivität dieser Faktoren zu messen, kann mittels des Dual-Luciferase Reporter Assays (Promega, Madison, WI, USA) die Expressionsrate des Firefly Luciferase Reportergens ermittelt werden. Hierfür wird ein Plasmid, welches das Luciferasegen und den entsprechenden Transkriptionsfaktor enthält, in die Zielzelle lipofektiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wird zeitgleich ein Renilla Kontrollvektor eingebracht.

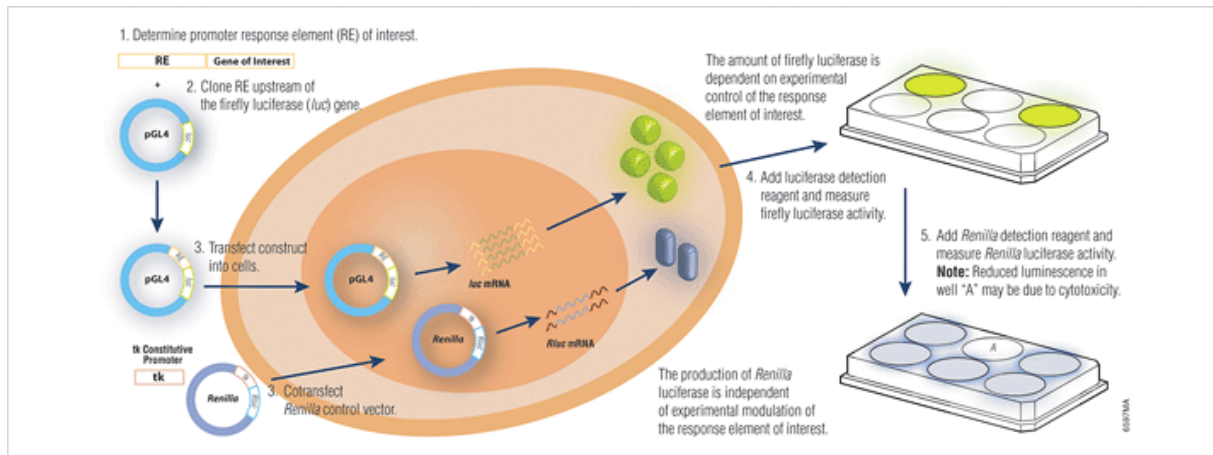


Abb. 18: Transfektion der Vektoren und anschließender Luciferase Assay
(<http://www.promega.com/uk/products/dual-luciferase.htm>).

Die Firefly Luciferase ist ein 61kDa großes monomeres Protein, welches die Oxidation von Luciferin katalysiert, wobei die zu messende Lichtemission erreicht wird. Aus D-Luciferin wird in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O_2 das Molekül Oxyluciferin (Abb. 19).

Die Renilla Luciferase ist ein 36kDa großes monomeres Protein, welches Coelenterate-Luciferin und Sauerstoff benötigt um das Produktmolekül Coelenteramid und die Lichtemission herzustellen.

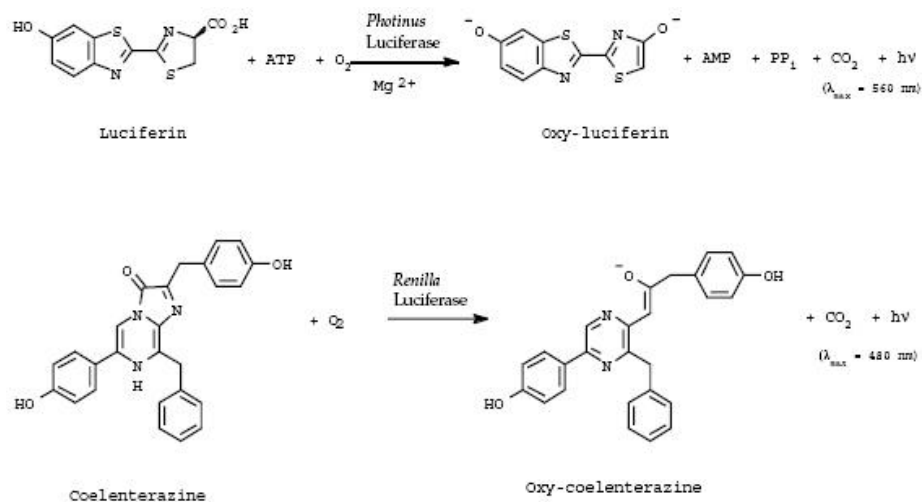


Abb. 19: Firefly und Renilla Luciferase katalysieren biolumineszente Reaktionen
(<http://www.biolab.cn/plus/view-241598-1.html>).

Für den Dual-Luciferase Reporter Assay wird das Medium der lipofektierten Zellen abgesaugt, diese werden mit PBS gewaschen und anschließend mit 150µl 1×Passiv Lysis Puffer/Well für 15 min inkubiert. Jedes Probenlysat wird in ein Eppendorfgefäß pipettiert und auf $-80^\circ C$ gelagert.

Die Proben müssen zur Reinigung bei 4°C und 150 rpm 3min abzentrifugiert und die Überstände abgenommen werden. 20µl Probe wird in jedes Well einer weißen 96-Wellplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster A) pipettiert.

Von dem Luciferase Assay Reagenz II werden 100µl/Well zugeführt um die Firefly Luciferase am Luminometer zu messen. 10 Sekunden dauert die Messung per Well. Anschließend werden 100µl Stop & Glo Reagenz/Well zugegeben um die Reaktion abzustoppen und die Renilla Luziferase, welche als Bezugsquelle dient, zu messen.

3.8 Analyse auf Protein- und Aktivitätsebene

3.8.1 Prostaglandin E₂-Elisa

Prostaglandin E₂ ist das primäre Produkt des Arachidonsäuremetabolismus.

Es wird wie die meisten Eikosanoide nicht in der Zelle gespeichert, sondern nach der exogenen Zugabe von Arachidonsäure und/oder der Zellaktivierung synthetisiert und in den Extrazellularraum abgegeben. Im Blutkreislauf beträgt die Halbwertszeit von PGE₂ durchschnittlich nur 30 Sekunden, da es durch den Prostaglandin 15-dehydrogenase-signalweg in eine inaktive Form das 13,14-dihydro-15-keto PGE₂ umgewandelt wird. Mit Hilfe des Prostaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonal (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) kann die PGE₂-Menge im Zellkulturüberstand gemessen werden.

Das Prinzip dieses kompetitiven Enzym-Immunoassays beruht auf einer limitierten Menge PGE₂ monoklonalen Antikörpers und der daraus folgenden Konkurrenz zwischen PGE₂ und einem PGE₂-acetylcholinesterase (AChE)-Konjugate (PGE₂ tracer). Die Konzentration des PGE₂-Tracers bleibt konstant, während die PGE₂-Menge in den Proben variiert. Das ProstaglandinE₂-acetylcholinesterase-Konjugat bindet an den PGE₂ monoklonalen Antikörper und ist in der Konzentration indirekt proportional zu der Menge des freien Prostaglandins. Dieser Antikörperkomplex bindet an einen polyklonalen Ziege-Anti-Maus IgG, mit welchem die Detektionsplatte beschichtet ist. Die Platte wird von ungebundenen Substanzen gewaschen und das Ellman's Reagenz leitet die enzymatische Reaktion ein. Die Intensität der gelben Farbe wird photometrisch bei 412nm gemessen. Sie ist proportional der PGE₂-Tracermenge und indirekt proportional der Konzentration des freien ProstaglandinsE₂.

Zubereitung der Assayreagenzien vor dem Versuch:

Das EIA Puffer und Waschpuffer Konzentrat wird mit Ultra Pure Water gelöst. Zu dem Waschpuffer werden noch 0,5ml/L Tween 20 zugefügt.

Der 100dtn Prostaglandin E₂ AChE Tracer wird mit 6ml EIA Puffer gelöst und für 2 Wochen bei 4°C gelagert.

Der Tracer Dye wird 1:100 (60µl) zu dem Prostaglandin E₂ AChE Tracer zugegeben.

Der 100dtn Prostaglandin E₂ Monoclonal Antibody wird ebenfalls mit 6ml EIA Puffer verdünnt.

Der Antiserum Dye wird in der gleichen Menge wie der Tracer Dye 1:100 zu dem Antiserum hinzugefügt.

Herstellung des Prostaglandin E2 Standards:

Das PGE₂ Standardkonzentrat wird mit 1ml EIA Puffer gelöst und auf eine Konzentration von 10ng/ml gebracht. Dieses ist für 4 Wochen bei 4°C haltbar. Um eine Standardreihe festzulegen, werden 8 Eppendorfgefäße bereitgestellt. Der erste Standard wird 1:10 mit Behandlungsmedium eingesetzt und von ihm ausgehend wird die Verdünnungsreihe 1:2 fortgesetzt.

Versuchsdurchführung:

Die Zellen wurden in 6-Well Platten in Parallelbestimmung kultiviert, behandelt und nach 24h Stunden wurden die Überstände abgenommen und auf -80°C eingefroren.

Die 96-Wellplatte, welche mit polyklonalen Ziege-Anti-Maus Antikörper beschichtet ist, enthält folgende Standards:

Blank: Dieser beschreibt den Absorptionshintergrund, welcher allein durch das Ellmans Reagenz hervorgerufen wird. Es sollten mindestens 2 Blankwells gemessen werden. Dieser Wert wird von allen Wells abgezogen.

Totale Aktivität: Dies ist die totale enzymatische Aktivität des AChE-gekoppelten Tracers.

NSB (Non specific binding): Diese nicht-immunologische Bindung des Tracers zum Well findet auch bei Abwesenheit des spezifischen Antikörpers statt.

B_0 (Maximale Bindung): Dies ist die maximale Menge des Tracers, welche durch den Antikörper gebunden werden kann, bei Abwesenheit des freien Prostaglandins.

Von jeder Probe werden in Doppelbestimmung 50µl in jedes Well pipettiert.

Tab. 4 : Volumina der Arbeitsreagenzien.

Well	EIA Puffer	Sample	Tracer	Antikörper
Blank	-	-	-	-
Total Activity	-	-	-	-
NSB	100µl	-	50µl	-
B_0	50µl	-	50µl	50µl
Probe	-	50µl	50µl	50µl

Die Platte wird für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Nachher wird 5-mal gewaschen und das Ellmans Reagenz für 60-90 min zugegeben. Die Platte wird bei 420nm gemessen.

3.8.2 VEGF-Elisa

Der vaskuläre Permeabilitätsfaktor VEGF (Vascular endothelial growth factor) ist ein homodimeres 34-42kDa großes, heparin-bindendes Glykoprotein. Speziell für Endothelzellen besitzt dieses angiogene, mitogene und vaskuläre permeabilität-erhöhende Aktivitäten. VEGF fungiert in vitro als potentes endotheliales Zellmitogen. In vivo spielt er sowohl bei der Induzierung der Angiogenese als auch bei der Erhöhung der microvaskulären Permeabilität eine tragende Rolle. Dieser Faktor fördert die Extravasation von Plasmafibrinogen, welche zu einer Ablagerung des Fibrins und einer daraus resultierenden Veränderung der tumor-extrazellulären Matrix führt. Dieser Prozess erhöht die Migration von Makrophagen, Fibroblasten und endothelialen Zellen. Basierend auf diesem Wissen erhält VEGF eine große Funktion bei Entzündungen und während normaler und pathologischer Angiogenese. Die Bereiche Wundheilung, Embryonalentwicklung, Wachstum und Metastasierung von soliden Tumoren stehen im engen Zusammenhang mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Dieser Elisa ist ein quantitativer Sandwich Enzym Immunassay. Die Bezeichnung Sandwich beruht auf der Bindung zweier Antikörper an unterschiedlichen Epitopen des zu detektierenden Antigens. Die 96-Wellplatte ist mit einem spezifischen monoklonalen VEGF-Antikörper beschichtet an dem das vorkommende VEGF aus Proben und Standards gebunden

wird. Durch einen zweiten enzymgebundenen polyklonalen VEGF Antikörper wird bei entsprechender Substratzugabe die VEGF Konzentration sichtbar gemacht. Um die Reaktion abzustoppen wird eine Lösung zugegeben, welche den Farbumschlag von blau nach gelb einleitet. Die gemessene gelbe Farbintensität ist proportional der VEGF Konzentration. Die Messung findet bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 570nm statt.

Versuchsdurchführung:

Für die VEGF Standardreihe wird eine Stocklösung von 2000pg/ml hergestellt und für 15min inkubiert. Anschließend wird die Reihe 1:2 weiterverdünnt.

In jedes Well wurden 50µl Assay Diluent RD1W pipettiert. Die Proben wurden aufgrund zu hoher Konzentration 1:10 verdünnt und mit 50µl/Well in den Versuch eingesetzt. Die 96-Wellplatte wurde für 2 Stunden auf Raumtemperatur gestellt. Die Platte wurde 3× gewaschen und mit 200µl Antikörper-Konjugate/Well versehen. Ein zweites Mal folgen 3 Waschschrte und anschließend werden 200µl Substratlösung lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur zugegeben. Um die Reaktion abzustoppen werden 50µl Stopplösung zugefügt und die VEGF Konzentration bzw. die Farbintensität wird bei 450nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540nm gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung der Tocopherole auf die Hydrogenperoxid-Entwicklung

4.1.1 Zellviabilität mit α -Tocopherol

Um Wachstum und Proliferation der unterschiedlichen Zelllinien zu bestimmen wurden 5×10^4 Zellen pro Well in eine 24-Wellplatte gesetzt. Es wurden verschiedene Konzentrationen (3,125 μ M; 6,25 μ M; 12,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M) des α -Tocopherols, welches in serumfreien Medium mit BSA aufgenommen wurde, für 24 Stunden auf den beiden Zelllinien HT29 und LT97-3 belassen. Um für weitere Versuche die Schutzwirkung bzw. geeignete Konzentration des Antioxidans zu ermitteln, wurde mittels Neutralrottest ausgewertet.

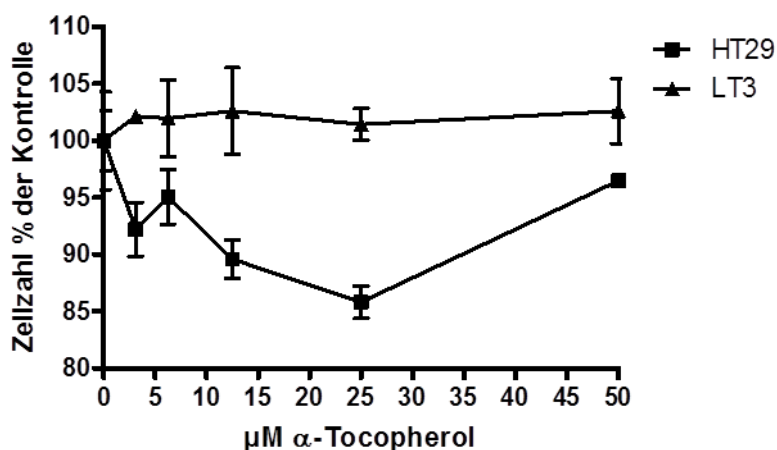


Abb. 20: Zellviabilität nach 24h α -Tocopherol Behandlung der Zelllinien HT29 und LT97-3.

Die Viabilität der beiden Zelllinien durch α -Tocopherol Behandlung wurde mittels Neutralrottest bestimmt. Die Zellen wurden 5×10^4 per Well angesetzt und 24h mit α -Tocopherol-Konzentrationen von 3,125 μ M; 6,25 μ M; 12,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M behandelt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von Quadruplikaten.

In Abbildung 20 sind deutliche Unterschiede zwischen Adenom- und Karzinomzelllinie zu erkennen. Während LT97-3 Zellen trotz Konzentrationsanstieg in ihrer Zellzahl konstant blieben, zeigten HT29-Zellen nach einem dosisabhängigen Abfall der Viabilität bis 25 μ M, ab einer Konzentration von 25 μ M eine gesteigerte Zellviabilität.

Um in weiteren Versuchen die Schutzfunktion der Tocopherole zu untersuchen, wurde eine Konzentration von 50 μ M α -Tocopherol verwendet, da diese in beiden Zelllinien nur sehr geringen Zellverlust aufwies.

4.1.2 Untersuchung der intrazellulären Hydrogenperoxid-Entwicklung

Um die intrazelluläre Bildung von Hydrogenperoxid und die antioxidativen Schutzfunktionen der α - und γ -Tocopherole zu untersuchen, wurden Vorversuche mit Dichlorofluorescein-FACS durchgeführt.

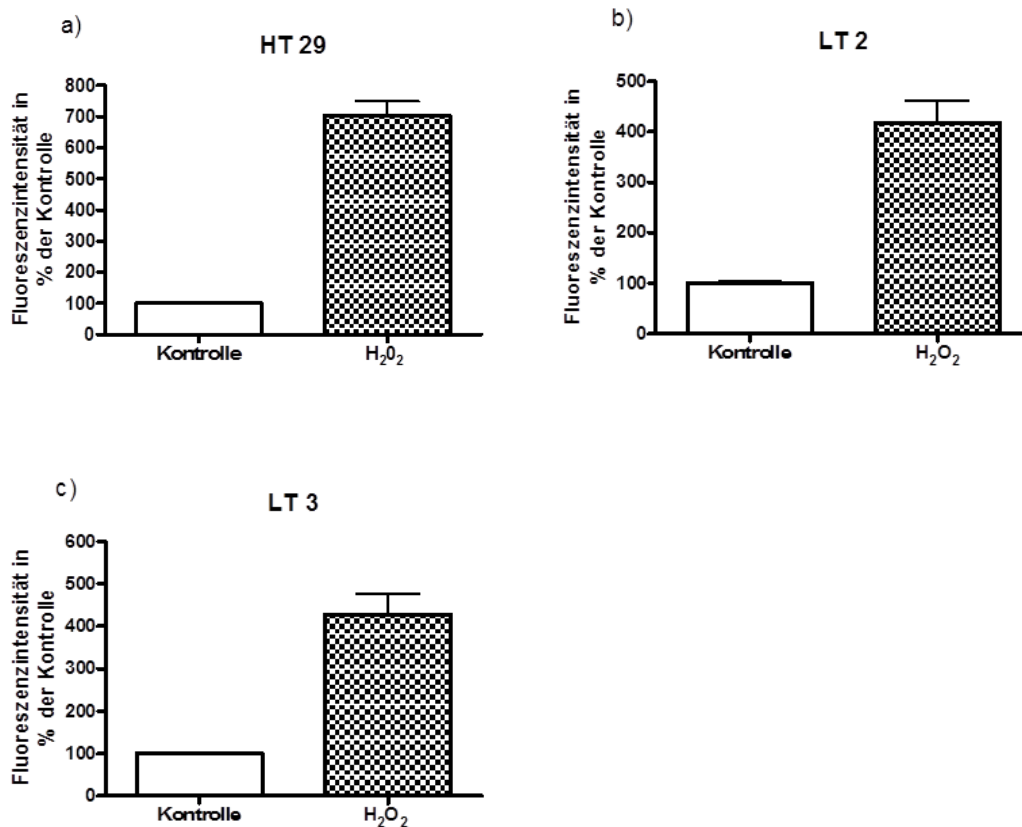


Abb. 21 a-c: DCF-FACS-Analyse nach 15-minütiger H₂O₂-Behandlung der 3 Zelllinien.

1×10^6 Zellen der Zelllinien HT29, LT97-2 und LT97-3 wurden 15 min mit 1mM H₂O₂ im Brutschrank inkubiert. Es wurde mit DCF-FACS-Analyse ausgewertet. Der Versuch wurde dreimal jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert der absoluten Werte $\pm$ Standardabweichung.

Die 3 Zelllinien in Abbildung 21 wurden unbehandelt 15min mit H₂O₂ im Brutschrank inkubiert, um anschließend mittels eines FACS-Gerätes die zelluläre H₂O₂-Konzentration zu ermitteln. Die Karzinomzelllinie reagierte sehr sensitiv und wies durch die 15-minütige Exposition mit H₂O₂ sehr hohe Konzentrationen auf. Dieses hohe Stressniveau wurde von den Adenomzelllinien ebenfalls erreicht.

Die antioxidative Wirksamkeit der Tocopherole auf die intrazelluläre Hydrogenperoxidbildung wurde mit Hilfe des DCF-FACS untersucht. Die Zellen in Abbildung 22 wurden 24h mit α -Tocopherol vorbehandelt und anschließend 1,5h mit 20 μ M LOOH und DCFH-DA im Brutschrank inkubiert.

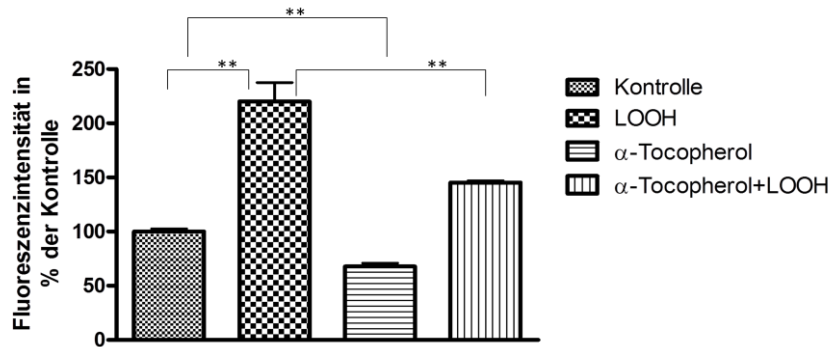


Abb. 22: H_2O_2 -Bildung nach 24h 50 μ M α -Tocopherol Behandlung und anschließender 1,5-stündiger 20 μ M LOOH Inkubation der Zelllinie HT29.

Durch die Behandlung mit LOOH zeigen HT29 eine starke Erhöhung der H_2O_2 -Bildung und somit ein sehr signifikantes Ergebnis $p \leq 0,01$ (** $p = 0.0022$). α -Tocopherol bezogen auf die Kontrolle zeigt ebenfalls ein sehr signifikantes Ergebnis ** $p = 0.0013$. Die Schutzwirkung des α -Tocopherols gegenüber LOOH konnte sehr signifikant $p \leq 0.01$ (** $p = 0.0055$) aufgezeigt werden. Die Ergebnisse wurden mittels T-Test ermittelt und zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Der Versuch wurde zweimal in Duplikaten durchgeführt.

In weiteren Versuchen wurde ebenfalls der Schutzeffekt des γ -Tocopherols untersucht.

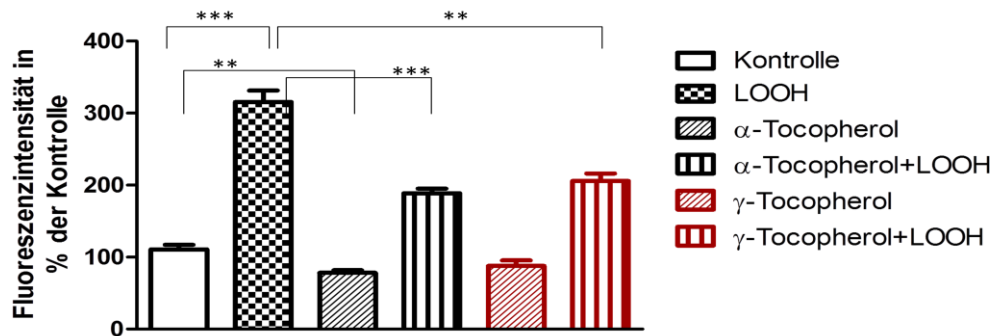


Abb. 23: H_2O_2 -Bildung der HT29 Zellen mit 24h 50 μ M α - und γ -Tocopherol Behandlung und anschließender 1,5-stündiger 20 μ M LOOH-Behandlung.

LOOH erhöht die H_2O_2 -Bildung höchst signifikant $***p \leq 0.0001$. Die alleinige Behandlung mit α -Tocopherol brachte die H_2O_2 -Bildung unter den Kontrollwert $**p = 0.0044$. Sowohl α -Tocopherol ($***p = 0.0003$) als auch γ -Tocopherol ($**p = 0.0012$) weisen signifikante antioxidative Schutzwirkungen bei der Behandlung mit LOOH auf. Der Versuch wurde zweimal in Duplikaten durchgeführt. Ausgewertet wurde mittels T-Test. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Abbildung 23 zeigt, dass α - und γ -Tocopherol signifikante Hemmungen der Wasserstoffperoxidbildung ermöglichen. Die alleinige Behandlung mit α -Tocopherol führte zu einer 33% Verringerung der H_2O_2 -Bildung, bezogen auf den Kontrollwert. Sowohl α -Tocopherol als auch γ -Tocopherol zeigen in der Kombination mit LOOH Senkungen der H_2O_2 -Bildung von 35% und 40,1%. Sie weisen daher signifikante antioxidative Schutzwirkungen bei der Behandlung mit LOOH auf und sind in der Lage die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu verringern.

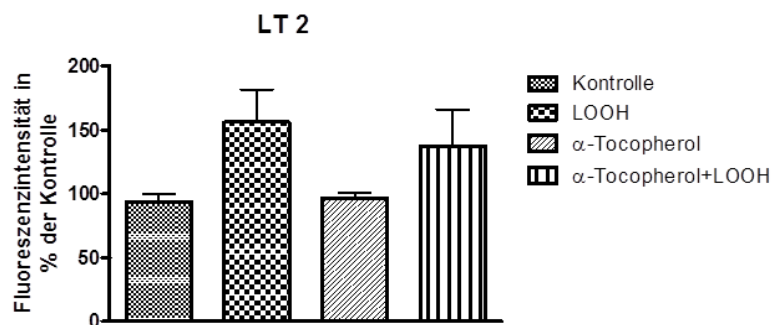


Abb. 24: H_2O_2 -Bildung der LT97-2 Zellen mit 24h α -Tocopherol und anschließender 1,5-stündiger 20 μ M LOOH-Behandlung.

Die Adenomzelllinie LT97-2 in Abbildung 24 zeigt keine signifikanten Schutzwirkungen in der Hemmung des H_2O_2 . Es konnte eine Verminderung durch α -Tocopherol gezeigt werden,

jedoch konnte diese durch die hohe Standardabweichung der beiden Versuche nicht signifikant ($p = 0.6409$) aufgezeigt werden.

In einem zweiten Versuch mit der Adenomzelllinie LT97-2 konnte eine Wirkung des α -Tocopherols nachgewiesen werden.

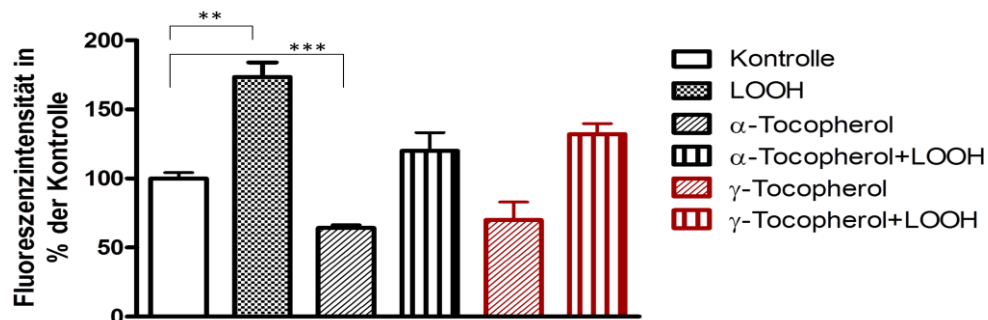


Abb. 25: H_2O_2 -Bildung nach 24-stündiger Behandlung mit α - und γ -Tocopherol und anschließender 20 μM LOOH Zugabe der LT97-2-Zelllinie.

LOOH zeigt ein sehr signifikantes Ergebnis (** $p = 0.0012$) aus zwei unabhängigen Versuchen mittels Duplikaten. α -Tocopherol(*** $p = 0.0003$) zeigt eine höchst signifikante Wirkung aus einem Versuch mit Duplikaten. Schutzwirkungen des α - und γ -Tocopherols konnten aufgrund der höheren Standardabweichungen nicht signifikant nachgewiesen werden ($p = 0.0852$; $p = 0.0857$), es konnte jedoch eine Verminderung festgestellt werden.

4.1.3 Neutralrotbestimmung und Hydrogenperoxid-Entwicklung mit Hämatin

In weiteren Versuchen wurde die Schutzfunktion von α -Tocopherol unter Hämatin-Behandlung untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24h mit 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M und 20 μ M Hämatin in serumfreien Medium behandelt und anschließend ein Neutralrotest durchgeführt.

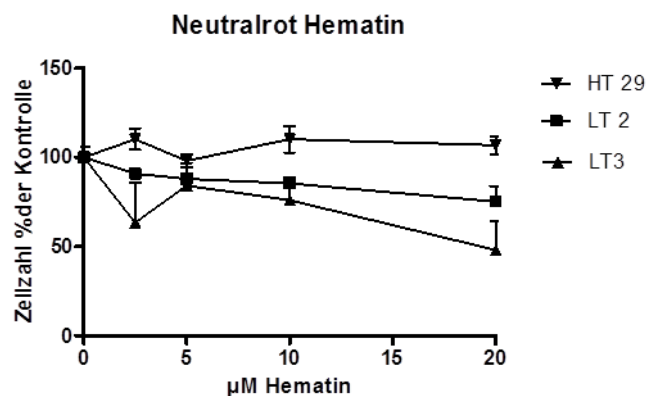


Abb. 26: Viabilität nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Hämatin-Konzentrationen der Zelllinien HT29,LT97-2 und LT97-3.

Die Zellen wurden 5×10^4 aufgeteilt und 24h mit Hämatin inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mittels Neutralrot gemessen. Die Ergebnisse zeigen den MW $\pm$ Stabw. bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Für weitere Versuche wurden die Zelllinien HT29 und LT97-3 verwendet. Konzentrationen von 5 μ M und 20 μ M wurden eingesetzt. Die H₂O₂-Bildung durch Hämatinbehandlung wurde mittels Dichlorofluorescein-FACS ermittelt. Die Zellen wurden nach einer 24-stündigen Behandlung mit α -Tocopherol für 1,5h mit Hämatin und DCFH-DA inkubiert.

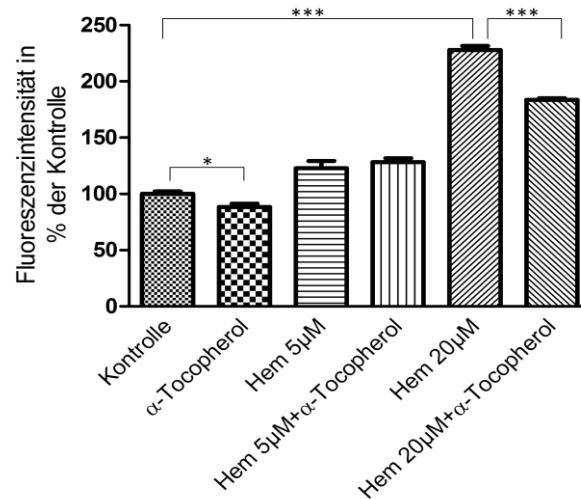


Abb. 27: H₂O₂-Bildung nach 24h Behandlung mit α -Tocopherol und anschließender 1,5-stündiger 5 und 20 μ M Hämatininkubation bei HT29.

α -Tocopherol zeigt gegenüber der Kontrolle ein signifikantes Ergebnis * p = 0.0234. Hämatin 20 μ M zeigt eine sehr starke Erhöhung der H₂O₂ Konzentration *** p < 0.0001, welche durch α -Tocopherol höchst signifikant abgeschwächt werden konnte *** p < 0.0001. Der Versuch wurde zweimal in Duplikaten durchgeführt. Ausgewertet wurde mittels T-Test.

In Abbildung 27 zeigt α -Tocopherol eine höchst signifikante Schutzwirkung gegenüber Hämatin. Somit konnte bei einer Hämatinkonzentration von 20 μ M α -Tocopherol als Radikalfänger agieren, indem er die H₂O₂-Bildung um 19,4% herabsetzte.

Auch bei der Adenomzelllinie LT97-3 in Abbildung 28 konnte die Schutzfunktion des α -Tocopherols nachgewiesen werden. Sowohl bei einer Konzentration von 5 μ M Hämatin als auch bei 20 μ M Hämatin zeigte sich eine signifikante Abschwächung der H_2O_2 -Bildung durch α -Tocopherol von 14%.

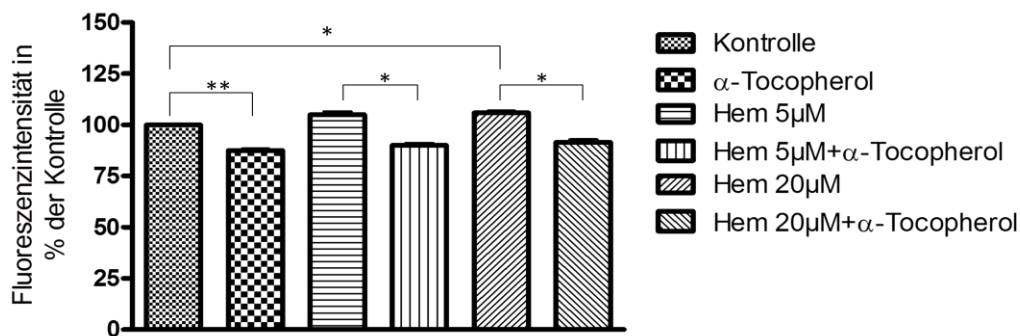


Abb. 28 H_2O_2 -Bildung der LT97-3 nach 24h α -Tocopherol Behandlung und anschließender 1,5-stündiger Hämatininkubation.

LT97-3 Zellen wurden 24h mit α -Tocopherol und anschließend mit 5 μ M bzw. 20 μ M Hämatin behandelt. Eine Konzentration von 20 μ M Hämatin zeigt gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine signifikante Erhöhung (* p = 0.0251). α -Tocopherol weist eine sehr signifikante Schutzwirkung mit ** p = 0.0049 auf. In Kombination mit Hämatin konnte ebenfalls ein signifikant schützender Effekt nachgewiesen werden. Bei 5 μ M * p = 0.0144, bei 20 μ M * p = 0.0102. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

4.2 Auswirkungen der Tocopherole auf Genexpressionsniveau

4.2.1 Die Hemmwirkung der Tocopherole auf die COX-2-Expression

Ziel dieser Versuche war es die LOOH-induzierte COX-2 Expression durch den Einsatz der Tocopherole zu verringern und dadurch einen Schutzeffekt vor Fettsäurehydroperoxid zu bieten (Jurek, 2003). Die Zellen wurden in 6-Wellplatten 24h mit 50 μ M α - und γ -Tocopherol behandelt. In den letzten 3h und 6h wurden die Zellen zusätzlich mit 20 μ M LOOH inkubiert. Die RNA wurde jeweils in Doppelbestimmungen isoliert um anschließend mit RT-PCR das Expressionsniveau zu ermitteln.

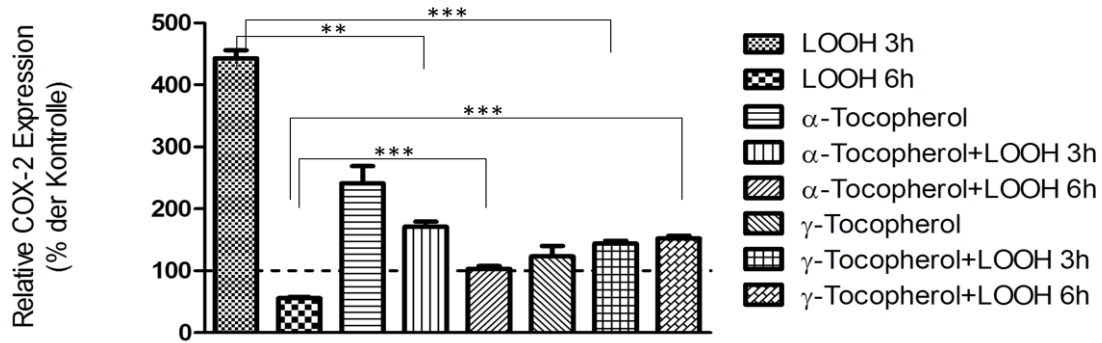


Abb. 29: COX-2-mRNA Expression in HT29 Zellen bei 24-stündiger 50µM α- und γ-Tocopherol Behandlung mit 3h und 6h 20µM LOOH Einwirkung.

Die Ergebnisse der RT-PCR sind auf die unbehandelte Kontrolle bezogen und stellen die gepoolten Ergebnisse aus 2 unabhängigen Versuchen (MW±Stabw.) dar. Mit *** gekennzeichnete Versuchsgruppen unterscheiden sich von der Kontrolle mit $p \leq 0.001$. γ-Tocopherol konnte bei 3h LOOH-Behandlung höchst signifikanten Schutz bieten $***p \leq 0.0001$. α-Tocopherol hemmte die COX-2 Expression bei einer 3 stündigen LOOH Behandlung ebenfalls sehr signifikant $**p = 0.0033$. Die Kombination von α- bzw. γ-Tocopherol und 6h LOOH zeigt eine höchst signifikante Abschwächung der COX-2 Expression.

Abbildung 29 zeigt eine sehr starke Induktion der COX-2 Expression bei 3h LOOH Inkubation und fällt jedoch bei 6h bis unter die Kontrolle stark ab. α-Tocopherol allein verursachte ebenfalls erhöhte COX-2 Expression, unterdrückte jedoch die LOOH-induzierte Expression signifikant ($p \leq 0.01$). Die alleinige Behandlung von γ-Tocopherol hatte keinen Einfluss auf die COX-2 Expression, hemmte aber ebenfalls die 3h und 6h LOOH-induzierte COX-2 Expression höchst signifikant.

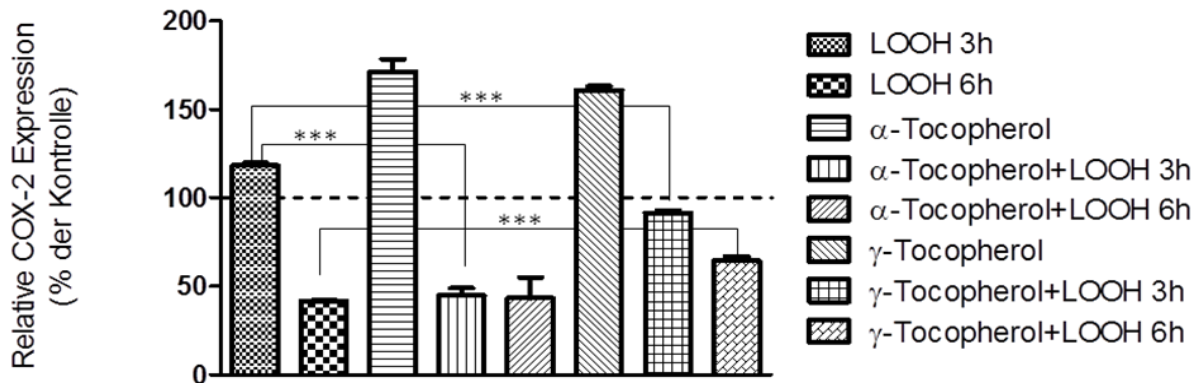


Abb. 30: COX-2 mRNA Expression in LT97-3 Zellen bei 24-stündiger 50μM α- und γ-Tocopherol Behandlung mit 3h und 6h 20μM LOOH Einwirkung.

α-Tocopherol konnte die COX-2 Expression bei 3h LOOH Behandlung höchst signifikant hemmen $***p = < 0.0001$, ebenso γ-Tocopherol $***p = 0.0002$. Bei 6h γ-Tocopherol Einwirkung war eine höchst signifikante Erniedrigung der COX-2 Expression zu verzeichnen. Die Ergebnisse zeigen den MW ± Stabw. zweier Versuche mit Quadruplikaten.

Die COX-2 Expression konnte bei der Adenomzelllinie LT97-3 in Abbildung 30 nicht stark durch LOOH induziert werden. Ein starker Abfall der Expression bis unter die Kontrolle von 3h auf 6h war zu verzeichnen. Während beide Tocopherole in alleiniger Behandlung eine deutliche Induktion von COX-2 bewirken, liegt eine Schutzwirkung in Kombination mit LOOH und eine Hemmung der COX-2 Expression vor. Dies ist sowohl für α- als auch für γ-Tocopherol bei einer LOOH Inkubation von 3h bzw. 6h nachzuweisen.

4.2.2 Die Schutzwirkung der Tocopherole auf die VEGF-Expression

In welchem Maße sich Tocopherole auf bestimmte Wachstumsfaktoren auswirken, wurde anhand des vaskulären epithelialen Wachstumsfaktors gezeigt. Es wurde untersucht inwieweit LOOH die VEGF Expression beeinflusst und ob Tocopherole die Wirksamkeit besitzen die Expression zu hemmen.

Die Zellen wurden in 6-Wellplatten angesetzt und 24h mit α- und γ-Tocopherol behandelt. In den letzten 3h beziehungsweise 6h wurde LOOH zugesetzt und anschließend in Doppelbestimmungen die RNA Isolation durchgeführt. Es wurde dieselbe RNA wie aus den COX-2 Versuchen verwendet.

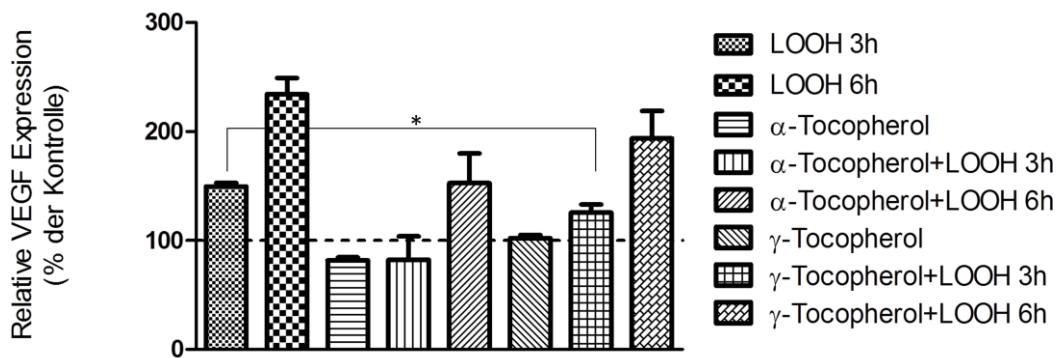


Abb. 31 : VEGF-mRNA Expression in HT29 Zellen bei 24-stündiger 50μM α- und γ-Tocopherol-Behandlung mit 3h und 6h 20μM LOOH Einwirkung.

γ-Tocopherol zeigt eine Schutzwirkung gegenüber der 3h LOOH Inkubation. *p = 0.0488

In Abbildung 31 zeigt die alleinige LOOH-Behandlung einen hohen Anstieg der VEGF Expression von 3 auf 6 Stunden. Die VEGF Expression LOOH behandelter Zellen konnte durch α-Tocopherol nicht signifikant gehemmt werden, p = 0.0584 bzw. p = 0.0586 bei 3h bzw. 6h LOOH Inkubation. Jedoch konnte γ-Tocopherol bei einer 3-stündigen LOOH Behandlung einen signifikanten Schutz (*p = 0.0488) bieten.

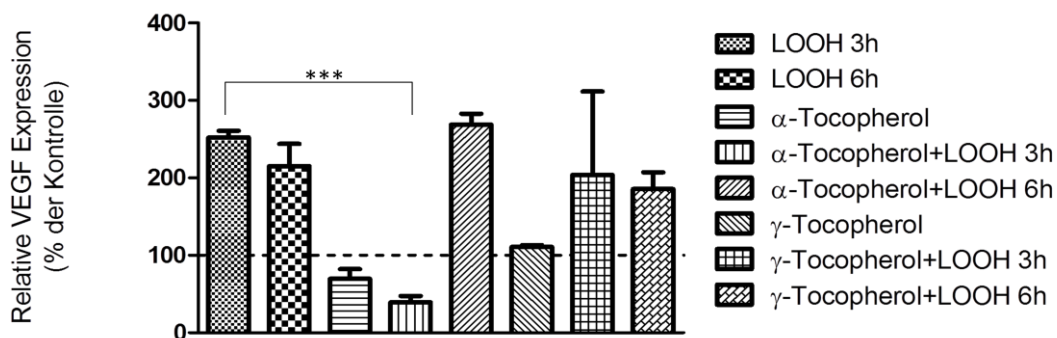


Abb. 32: VEGF-mRNA Expression in LT97-3 Zellen bei 24-stündiger 50μM α- und γ-Tocopherol-Behandlung mit 3h und 6h 20μM LOOH Einwirkung.

Höchst signifikant konnte die VEGF Expression mittels α-Tocopherol bei 3h LOOH Behandlung gehemmt werden ***p = 0.0005.

Bei der Adenomzelllinie LT97-3 in Abbildung 32 zeigte die Behandlung mit LOOH zwischen 3h und 6h keinen signifikanten Unterschied in der Zu- oder Abnahme der VEGF Expression. Die Kombination von LOOH mit α-Tocopherol hatte jedoch von 3h auf 6h gegensätzliche Auswirkungen der VEGF Expression. Bei 3-stündiger Behandlung konnte eine höchst signifikante Hemmung der VEGF Expression verzeichnet werden, während bei 6 Stunden α-Tocopherol keinen Schutz gegenüber LOOH bot.

4.3 Die Schutzmechanismen: Antioxidative Enzyme und Tocopherole als Radikalfänger

4.3.1 Katalase Aktivität und die Beeinflussung durch Tocopherole

Katalase ist ein wichtiges antioxidatives Enzym, welches die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff katalysiert. In folgenden Versuchen wurde die Katalaseaktivität unter der Schutzwirkung von Tocopherol bei Behandlung mit LOOH untersucht. Zuvor mussten jedoch einige Vorversuche zur Ausoptimierung der Reaktionen durchgeführt werden, um geeignete Standardbedingungen herzustellen. Insbesondere wurde die geeignete Samplemenge ausoptimiert.

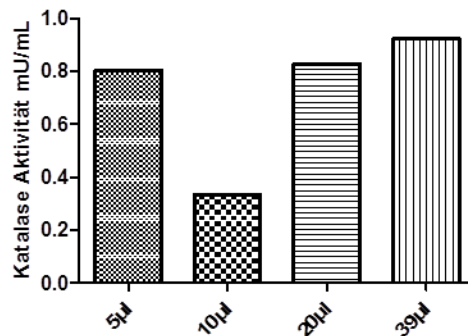


Abb. 33: Ausoptimierung verschiedener unbehandelter HT29-Samplemengen für die Katalase Aktivitätsmessung.

Abbildung 33 zeigt die Katalaseaktivität für Samplemengen von 5-39µl Zelllysate. Es konnte keine dosisabhängige Steigerung der Aktivität beobachtet werden. Um festzustellen, ob sich die Aktivitätswerte mit diesen Probenmengen bereits im Plateau der Dosis-Wirkungskurve befanden, wurden für weitere Versuche geringere Mengen verwendet.

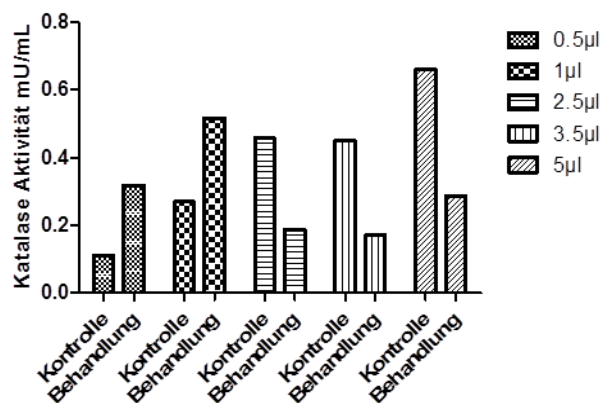


Abb. 34: Katalase Aktivität bei HT 29 nach 24-stündiger 50µM α -Tocopherol-Behandlung.

Für die Samplemengen 0.5µl und 1µl zeigt sich ein Anstieg der Katalaseaktivität durch Tocopherol relativ zur Kontrolle. Ab 2.5µl verändert sich die Aktivität und es kommt zu einem Abfall der Katalase durch Tocopheroleinwirkung.

Da die Samples in Abbildung 25 mit 0,5µl und 1µl eine steigende Katalaseaktivität durch Tocopherol erzielten, wurden diese für die LOOH Zeitkurve gewählt. 2,5µl wurden ebenfalls eingesetzt um die gegenteilige Tocopherolwirksamkeit mit LOOH zu überprüfen.

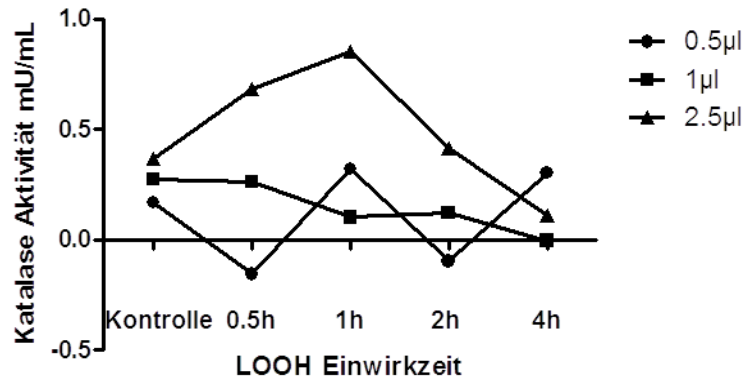


Abb. 35: LOOH-Zeitkurve bei HT 29 mit unterschiedlichen Samplemengen.

Die Katalaseaktivität der Zelllinie HT29 wurde zu 4 verschiedenen Zeitpunkten mit 3 unterschiedlichen Samplemengen mittels Katalase Assay Kit gemessen. Die Zellen wurden mit 20µM LOOH behandelt und nach 0.5h, 1h, 2h und 4h wurde die Katalaseaktivität gemessen.

In Abbildung 35 zeigen alle drei Samples bei 2h einen zeitlichen Abfall der Katalaseaktivität, daher wurde diese Zeitspanne zur weiteren LOOH Behandlung ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt besaß die Wirksamkeit des LOOH großen Einfluss auf den Rückgang der Katalaseaktivität. Die Samplemenge von 0.5µl wurde für weitere Versuche ausgeschlossen, da diese zu jedem gemessenen Zeitpunkt starken Schwankungen im LOOH Zeitverlauf unterworfen war.

Um die geeigneten Tocopherolkonzentrationen zur weiteren Untersuchung zu wählen, wurden Ausoptimierungen durchgeführt.

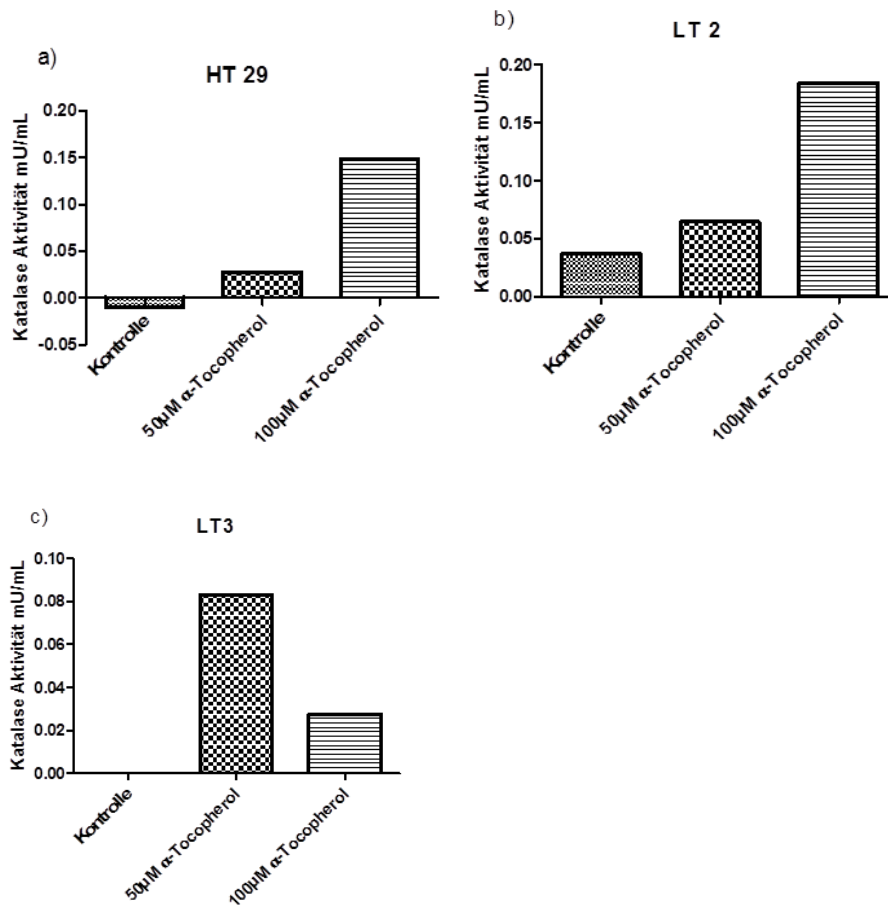


Abb. 36 a, b, c: Katalase Aktivität bei 3 Zelllinien mit unterschiedlichen Tocopherolkonzentrationen.

Bei jeder der 3 Zelllinien wurden die Konzentrationen 50 µM und 100 µM α -Tocopherol eingesetzt. Sie wurden für 24h auf den Zellen belassen und anschließend die Katalaseaktivität gemessen.

Die Zelllinien HT29 und LT97-2 in Abbildung 36 zeigen eine stärkere Katalaseaktivität bei 100 µM α -Tocopherol. Diese Konzentration wurde für die Untersuchung des Schutzeffektes verwendet. LT97-3-Zellen weisen eine stärkere Aktivität bei 50 µM auf, daher wurde diese Konzentration für weitere Versuche eingesetzt.

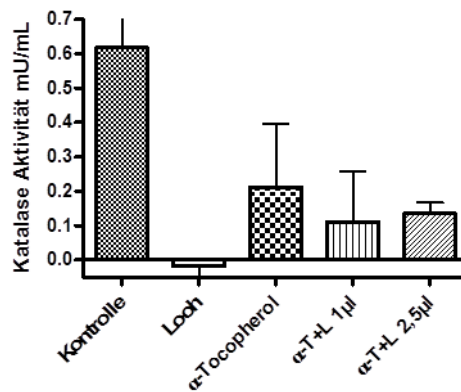


Abb. 37: Katalase Aktivität der Zelllinie HT29 bei 24-stündiger 100µM α -Tocopherol-Behandlung und 2-stündiger 20µM LOOH Einwirkung.

Die Katalaseaktivität in Abbildung 37 liegt bei LOOH-Behandlung unter der Kontrolle, α -Tocopherol aktiviert die Katalase. In der Kombination von α -Tocopherol + LOOH kann bei beiden Samplengmen ein Schutzeffekt verzeichnet werden, bei der Samplengme von 2,5µl war die Katalaseaktivität und der einhergehende Schutzeffekt noch etwas höher.

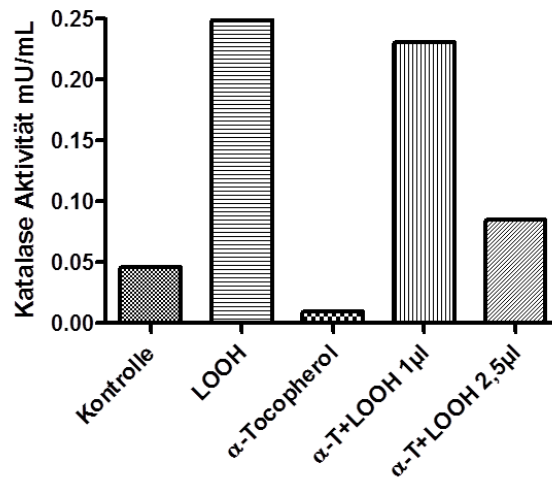


Abb. 38: Katalase Aktivität der Zelllinie LT97-2 bei 24-stündiger 50µM α -Tocopherol-Behandlung und anschließender 2-stündiger 20µM LOOH Einwirkung.

Bei der Adenomzelllinie LT97-2 in Abbildung 38 stieg die Katalaseaktivität durch die zweistündige LOOH Einwirkung stark an und wurde durch Tocopherol gehemmt. Durch die Sensitivität des Assays wies die Samplengme zwischen 1µl und 2,5µl große Unterschiede auf. 1µl der Kombination aktivierte die Katalase bis auf LOOH-Niveau. Bei 2,5 µl nahm sie wieder ab.

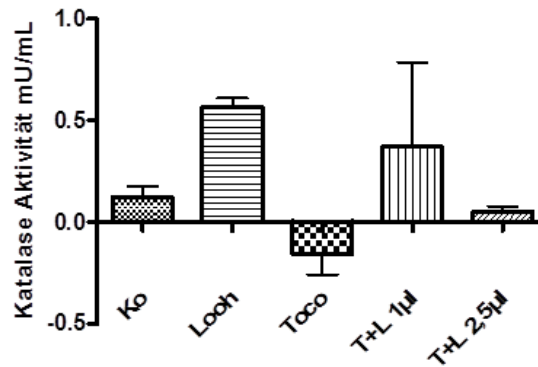


Abb. 39: Katalase Aktivität der Zelllinie LT97-3 bei 24-stündiger 50µM α -Tocopherol-Behandlung und anschließender 2-stündiger 20 µM LOOH Einwirkung.

LT97-3 Zellen zeigen einen Anstieg der Katalaseaktivität durch LOOH. 50µM α -Tocopherol hemmte die Aktivität und die Kombinationen zeigen einen Abfall bei Zunahme der Samplmenge von 1µl auf 2.5µl. Tocopherol zeigt in diesem Versuch eine Hemmung der Katalaseaktivität.

4.3.2 Superoxiddismutase und die Beeinflussung durch Tocopherole

Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von einem Superoxidanion in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff. In den folgenden Versuchen wurden die Auswirkungen des α -Tocopherols auf die SOD Aktivität untersucht. Vorerst wurden Ausoptimierungen durchgeführt, um die geeigneten Rahmenbedingungen für die Schutzfunktionsversuche zu schaffen.

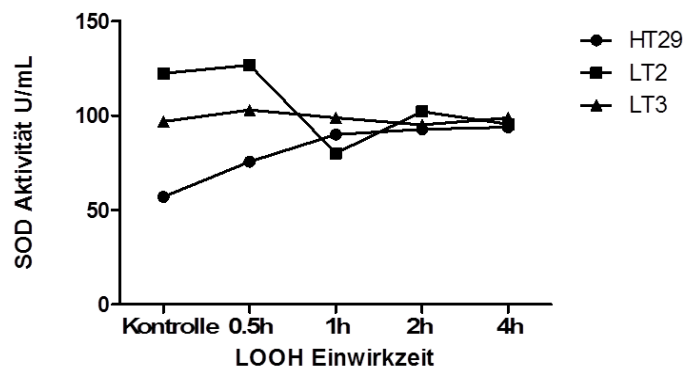


Abb. 40: LOOH-Zeitkurve mit 3 Zelllinien und unterschiedlichen Einwirkzeiten von 20µM LOOH bei Messung der SOD Aktivität.

Ziel der Zeitkurve in Abb.40 war es für jede der 3 Zelllinien eine geeignete Behandlungsdauer mit LOOH auszuoptimieren um optimale Bedingungen für Schutzfunktionsversuche zu erstellen. HT29 Zellen zeigten einen Anstieg in der SOD Aktivität mit länger andauernder Einwirkzeit. Es wurde für weitere Kombinationsversuche eine Behandlungsdauer von 0.5h festgelegt. Die Adenomzelllinie LT97-2 verhielt sich zu Beginn gegensätzlich, die SOD

Aktivität fiel von 0.5h-1h stark ab und stieg bei 1h-2h an. LT97-3 Zellen waren in der Zeitkurve keinen starken Veränderungen der SOD Aktivität unterworfen. Für weitere Versuche wurde eine Einwirkzeit von 1h gewählt.

Um geeignete α -Tocopherol Konzentrationen zu finden, wurden alle drei Zelllinien mit 50 μ M und 100 μ M behandelt.

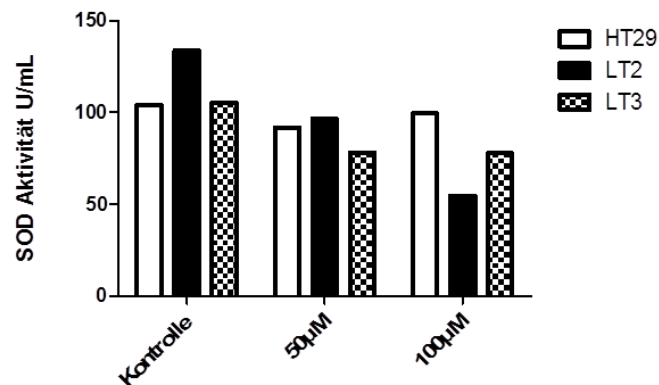


Abb. 41: Ausoptimierung bei 3 Zelllinien mit 50 μ M und 100 μ M α -Tocopherol-Behandlung.

In Abbildung 41 wurden geeignete α -Tocopherol Konzentrationen der drei Zelllinien ermittelt. Für HT29 wurde eine Konzentration von 100 μ M festgelegt und für weitere Versuche noch 150 μ M hinzugenommen. LT97-2 Zellen zeigen einen Abfall in der SOD Aktivität bei steigender α -Tocopherol Konzentration. Daher wurde eine Konzentration von 50 μ M für weitere Versuche festgelegt. LT97-3 weisen ebenfalls eine Abnahme in der SOD Aktivität auf, sie wurden jedoch von weiteren Schutzfunktionsversuchen ausgeschlossen, da in der LOOH Zeitkurve kaum Reaktionen zu verzeichnen waren.

Ausgehend von den Ausoptimierungen wurden die Samples auf einer 96-Wellplatte mittels des SOD Aktivitäts Assay Kit von Biovision detektiert und die Überstände der Zellen mit der enthaltenen SOD wurden anschließend bei 450nm mittels eines Mikroplattenlesers gemessen.

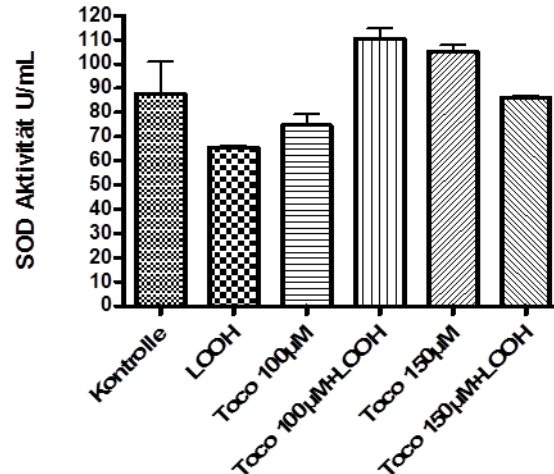


Abb. 42: SOD Aktivität der Zelllinie HT 29 bei 24-stündiger 100µM- und 150µM α -Tocopherol-Behandlung und anschließender 0,5-stündiger 20 µM LOOH Einwirkung.

Wie aus Abbildung 42 ersichtlich nahm die Aktivität des antioxidativen Enzyms, SOD, bei HT29 mit der Behandlung von LOOH ab. 100µM des α -Tocopherols zeigte geringe Aktivität, jedoch war bei 150µM eine stärkere Aktivität zu verzeichnen. Die Kombination von 150µM α -Tocopherol+LOOH wies einen Schutzeffekt auf.

LT97-2-Zellen in Abbildung 43 reagierten auf die LOOH Behandlung weder mit einer Erhöhung noch Senkung in der SOD Aktivität. Die Behandlung mit α -Tocopherol zeigte jedoch eine Erhöhung in der Aktivität.

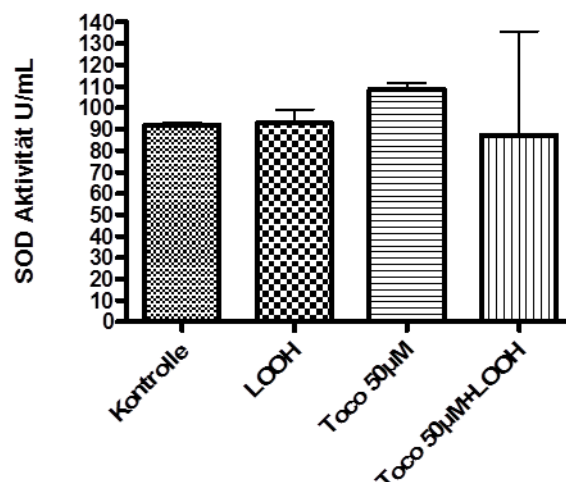


Abb. 43: Superoxiddismutase Aktivität der Zelllinie LT97-2 bei 24-stündiger 50µM α -Tocopherol-Behandlung und anschließender 1-stündiger 20 µM LOOH Einwirkung.

4.4 Auswirkungen der Tocopherole auf die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Mittels des Luciferase Assays wurde die Schutzwirkung der Tocopherole bezüglich der Aktivierung von NF- κ B überprüft. LOOH wurde für 24h auf den Zellen belassen.

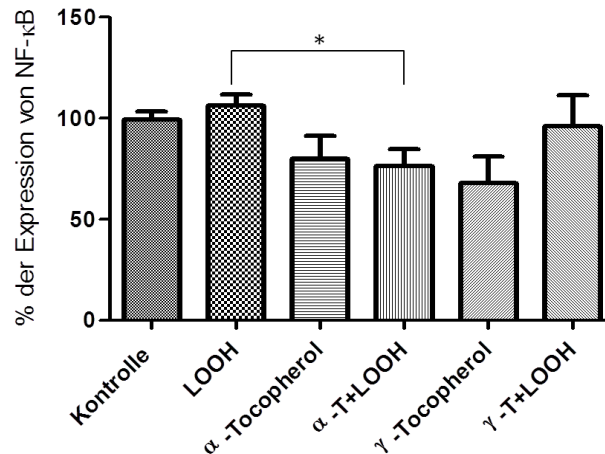


Abb. 44: NF- κ B-Expression der Zelllinie HT 29 bei 24-stündiger 50 μ M α - und γ -Tocopherol Behandlung und anschließender 24-stündiger 20 μ M LOOH Inkubation.

α -Tocopherol zeigt eine signifikant schützende Wirkung gegenüber LOOH. * p = 0.0407.

Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt.

In Abbildung 44 zeigt α -Tocopherol eine Hemmung der NF- κ B Expression und die Kombination mit LOOH eine schützende Wirkung. Die alleinige Behandlung mit γ -Tocopherol senkte die NF- κ B-Expression, jedoch konnte in der Kombination mit LOOH keine schützende Wirkung nachgewiesen werden.

Um signifikantere Ergebnisse zu erzielen und da vermutet wurde, dass 24h eine zu lange Behandlungsdauer mit LOOH darstellte, wurde der Versuch mit 6-stündiger Einwirkzeit wiederholt.

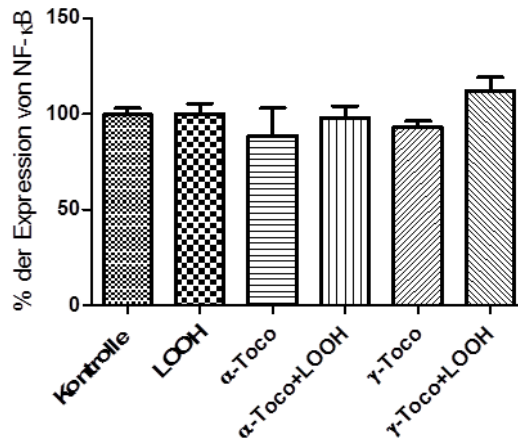


Abb. 45: NF-κB-Expression der Zelllinie HT 29 bei 6-stündiger 50μM α- und γ-Tocopherol Behandlung und anschließender 6-stündiger 20 μM LOOH Inkubation.

Es zeigte sich jedoch, dass 24h eine bessere Auswirkung auf die Schutzfunktion hatten, als 6h Inkubation. LOOH zeigte keine Erhöhung der Expression. α- und γ-Tocopherol konnten keine Schutzwirkung gegenüber LOOH bieten und zeigten somit keine Erniedrigung der Expression.

4.5 Nachweis der Schutzfunktion von Tocopherolen auf Proteinniveau

4.5.1 Bestimmung der PGE₂-Proteinmenge mittels ELISA

COX-2 spielt eine wesentliche Rolle als Katalysator in der Prostaglandin E₂ Synthese. Prostaglandin E₂ ist mitverantwortlich für die Angiogenese bei Tumoren und leistet ebenfalls seinen Beitrag bei der Proliferation und somit Hemmung der Apoptose bei Tumorzellen. Aufgrund dieses Wissens wurde in weiteren Versuchen die Wirkung der Tocopherole und ihrer Schutzfunktionen auf die Prostaglandin-Expression näher erläutert.

Die PGE₂ Expression wurde mittels ELISA überprüft.

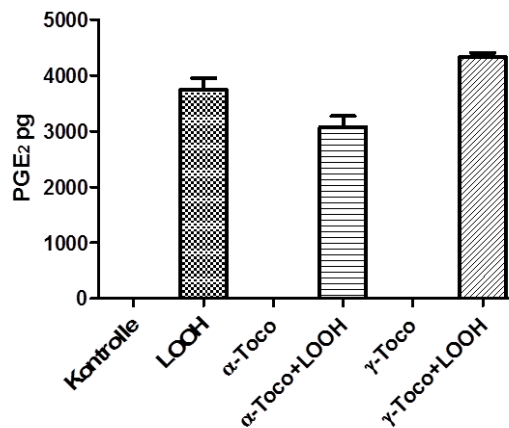


Abb. 46: Produktion von PGE₂ in der Zelllinie HT29.

Die Zellen wurden 24h mit α- und γ-Tocopherol behandelt und anschließend 24h mit 20 μM LOOH.

Da die Kontrolle, α-Tocopherol und γ-Tocopherol unter der Nachweisgrenze lagen, zeigte sich auch keine PGE₂ Expression. Deutlich ist jedoch eine Aktivierung durch LOOH in der Expression zu verzeichnen. In der Kombination mit LOOH konnte α-Tocopherol eine geringe Hemmung der Expression erreichen und seine Schutzfunktion entfalten.

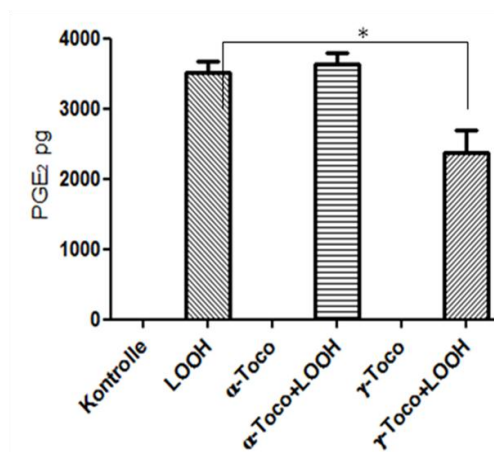


Abb. 47 Produktion von PGE₂ in der Zelllinie LT97-3.

Bei den LT97-3 Zellen in Abbildung 47 waren ebenfalls die Kontrolle, α-Tocopherol und γ-Tocopherol unter der Nachweisgrenze und zeigten dadurch keine Expression. Ein deutlicher Anstieg in der PGE₂ Produktion fand aufgrund der LOOH Behandlung statt. α-Tocopherol konnte in der Kombination mit LOOH keine Schutzwirkung vorweisen. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Schutzwirkung mittels γ-Tocopherol *p = 0.0205 welches die PGE₂ Expression signifikant hemmte.

4.5.2 Bestimmung der VEGF-Proteinmenge mittels ELISA

Mittels ELISA wurde die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors untersucht. Dieser spezielle Wachstumsfaktor ist für die Angiogenese bei Tumoren verantwortlich. Mittels des quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays konnte die VEGF Expression bestimmt werden.

Die Zellen wurden in 6-Wellplatten 24h mit α -Tocopherol behandelt und anschließend für weitere 24h mit LOOH inkubiert. Von den abgenommenen Überständen wurde mittels des Elisa die Expression ermittelt und die Auswirkung der Tocopherolbehandlung untersucht.

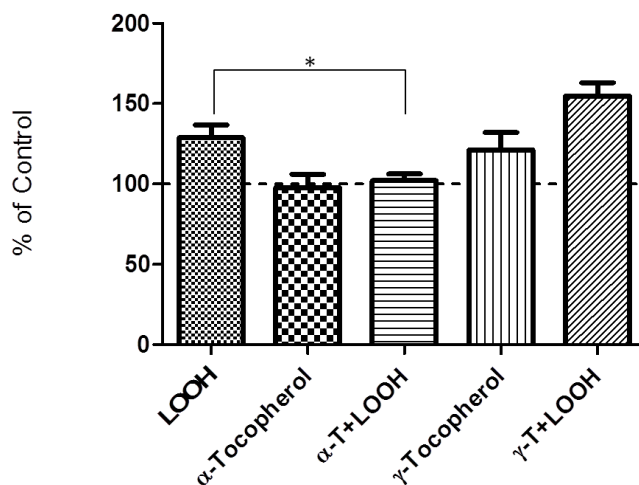


Abb. 48: Protein Expression von VEGF bei HT 29.

Die HT29 Zelllinie in Abbildung 48 zeigte eine Erhöhung der Expression durch 20 μ M LOOH. 50 μ M α -Tocopherol konnten das VEGF-Niveau auf die Kontrollebene hemmen und boten einen signifikanten Schutz in der Kombination mit LOOH *p = 0.0244. Keine positiven Auswirkungen zeigte γ -Tocopherol welches nicht in der Lage war die Expression zu hemmen beziehungsweise eine Schutzfunktion gegenüber LOOH zu übernehmen.

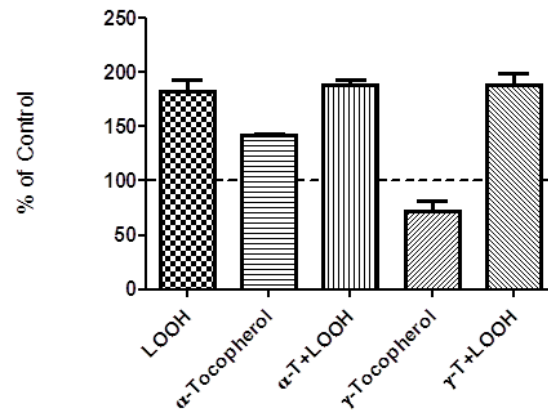


Abb. 49: Protein Expression von VEGF in der Zelllinie LT97-3

Bei der Zelllinie LT97-3 konnte γ -Tocopherol die Expression bis unter die Kontrollwerte hemmen. In der Kombination zeigen jedoch weder 50 μ M α -Tocopherol noch γ -Tocopherol schützende Effekte.

5 Diskussion

5.1 Hydrogenperoxidentwicklung durch Lipidhydroperoxide

Lipidhydroperoxide sind in der Lage Lipidperoxidationsreaktionen in Zellmembranen der Darmepithelzellen hervorzurufen und oxidativen Stress durch die Bildung freier Radikale zu verursachen. LOOH induziert die Bildung von hoch reaktivem Wasserstoffperoxid, welches über die Fenton-Reaktion zu Hydroxyl-Radikalen aufgespalten wird. Hydroxyl-Radikale reagieren mit den Basen der DNA und rufen Einzelstrangbrüche der DNA hervor, welche zu Mutationen führen können (Breen und Murphy, 1995), (Stone und Papas, 1997). Diese Mutationen verändern die normalen Zellfunktionsmechanismen und beeinflussen die Schritte der Promotion und Progression in der Kolonkarzinogenese in hohem Maße.

Aufgrund dieses Wissens wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit antioxidative Schutzwirkungen gegenüber freier Radikalbildung untersucht.

5.1.1 Tocopherole als nicht-enzymatische Schutzsysteme

In früheren Untersuchungen konnten Jurek et al. bereits zeigen, dass LOOH in der Karzinomzelllinie SW480 und in der Adenomzelllinie LT97 weitere Radikalbildung und toxische Effekte, bei zu hohen Dosierungen, erzeugt (Jurek et al., 2005). Tocopherole reagieren als Radikalfänger mit den fettsäurelöslichen Peroxylradikalen, unterbrechen dadurch die Lipidperoxidationskettenreaktion und reduzieren somit den endogenen oxidativen Stress einer Zelle (Stone und Papas, 1997), (Ames et al., 1995). In vivo Versuche zeigten eine Erhöhung des α -Tocopherol-Metabolismus durch Gabe oxidierter Fettsäuren (Liu und Huang, 1996). γ -Tocopherol weist ebenfalls eine antioxidative Wirkung in der Hemmung der Kettenreaktion auf, jedoch wird diesem Isomer eine geringere antioxidative Funktionalität zugesprochen, da es eine Wasserstoff-abgebende Methylgruppe weniger besitzt (Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die antioxidativen Schutzwirkungen von α - und γ -Tocopherol bei LOOH behandelten Adenom- und Karzinomzelllinien untersucht.

Hohe Schutzwirkungen bei Einwirkung von 20 μ M LOOH und der einhergehenden weiteren intrazellulären ROS-Bildung, in Form von Wasserstoffperoxid, konnten bei der Karzinomzelllinie HT29 sowohl durch α -Tocopherol als auch γ -Tocopherol aufgezeigt werden. Die H_2O_2 -Bildung konnte durch 50 μ M α -Tocopherol-Behandlung um 40,1% und

durch 50µM γ -Tocopherol-Behandlung um 35% gesenkt werden. Bei der Adenomzelllinie LT97-2 konnte eine Erniedrigung der H_2O_2 -Bildung durch die beiden Tocopherole erreicht werden. Die alleinige 50µM α -Tocopherol-Behandlung zeigte jedoch eine höchst signifikante Erniedrigung der Wasserstoffperoxid-Bildung. Jurek et al. konnte im Gegensatz dazu eine Schutzwirkung mit 30µM α -Tocopherol in der Kombination mit 80µM LOOH bei LT97 beschreiben, jedoch zeigte sich keine Unterdrückung der ROS-Bildung bei alleiniger 30µM α -Tocopherol Behandlung (Jurek, 2003). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind auf verschiedene Tocopherol- und LOOH-Konzentrationen zurückzuführen, zeigen jedoch in beiden Fällen eine Abnahme der H_2O_2 -Bildung durch Tocopherol-Behandlung.

Auf Basis unserer Ergebnisse zeigen sich deutliche Senkungen der H_2O_2 -Bildung durch α - und γ -Tocopherol-Behandlung. Schutzeffekte vor LOOH konnten bei HT29 mit einer höheren Signifikanz der α -Tocopherole gegenüber γ -Tocopherolen nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass α -Tocopherol auf chemischer Ebene eine höhere antioxidative Wirkung aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe besitzt.

Hämatin-Eisen wird über die Nahrung in Form von rotem Fleisch aufgenommen. Es induziert die Produktion genotoxischer freier Radikale und ihrer Produkte in Form von Epoxiden und Aldehyden durch Lipidperoxidationen mehrfach-ungesättigter Fettsäuren (Bastide et al., 2011). N-Nitrosamine (Bingham et al., 1996), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und heterozyklische Amine, welche durch weitere Verarbeitung des Fleisches bei hohen Temperaturen entstehen, besitzen ebenfalls karzinogene Wirkung (Sugimura et al., 2004).

Aufgrund dieser Untersuchungen besitzt eine hohe Hämatin-Eisen-Aufnahme und eine damit einhergehende erhöhte Lipidperoxidation eine wichtige Funktion in der Kolonkarzinogenese. Verschiedene Studien zeigten durch α -Tocopherol-Behandlung eine antioxidative Wirkung bei erhöhter Hämatin-Aufnahme. Durch α -Tocopherol konnte die Peroxyl-Radikal Produktion vermindert und eine weitere Lipidperoxidation unterbrochen werden (Vulcain et al., 2005). In einer weiteren Studie an Ratten konnte durch α -Tocopherol-Zugabe eine verminderte Lipidperoxidation nachgewiesen werden (Pierre et al., 2013).

Unter diesen Aspekten wurde in dieser Arbeit die Schutzwirkung der Tocopherole auf Hämatin-Einwirkung bei HT29 und LT-3 Zellen und dessen weitere Peroxidentwicklung getestet.

Eine 20µM Hämatin-Inkubation der HT29 Zellen führte zu einer höchst signifikanten Erhöhung der H₂O₂-Bildung. In Kombination mit α-Tocopherol zeigte sich eine sehr starke Abschwächung der Peroxidbildung. Somit konnte α-Tocopherol eine antioxidative Schutzwirkung gegenüber Hämatin ausüben. Bei der Adenomzelllinie LT97-3 konnte α-Tocopherol, sowohl bei einer Hämatinkonzentration von 5µM als auch bei 20µM, eine protektive Wirkung vor erhöhter ROS-Bildung erzielen. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten anderer Studien in der Erhöhung der H₂O₂-Bildung durch Hämatin-Eisen und die antioxidative Schutzwirkung von α-Tocopherol (Pierre et al., 2013), (Vulcain et al., 2005). Da die Schutzfunktion in meiner Arbeit auch in der Adenomzelllinie LT97-3 gezeigt werden konnte, ist die weitere Untersuchung für krebspräventive Studien von Interesse.

5.1.2 Enzymatische Schutzsysteme und die Beeinflussung durch Tocopherole

Oxidativer Stress entsteht durch erhöhte ROS Bildung und die Abnahme der antioxidativen Kapazität einer Zelle. Enzymatische Schutzsysteme wie Katalase und Superoxiddismutase (SOD) vermitteln den Abbau hochreaktiver Radikale und bieten so eine endogene Stressreduktion (Klaunig et al., 1998).

In vivo konnte bei Ratten durch oxidative Stressinduktion eine Erniedrigung der Katalase- und Superoxiddismutase-Aktivität festgestellt werden (Kim and Lee, 1997). Durch Katalase konnte durch antioxidative Schutzeffekte eine ROS-gesteuerte Gewebeschädigung gehemmt werden (Nishikawa et al., 2009). In Mesangialzellen wurde eine erniedrigte Katalase-Aktivität durch H₂O₂-Induktion nachgewiesen (Venkatesan et al., 2007).

In meinen Untersuchungen zeigten HT29 Zellen eine Erhöhung der Katalase-Aktivität durch alleinige Gabe von 100µM α-Tocopherol. Es konnte ebenfalls eine unterstützende Schutzfunktion des α-Tocopherols gegenüber LOOH-induziertem Verbrauch von Katalaseaktivität beobachtet werden. In den Adenomzelllinien LT97-2 und LT97-3 hingegen führte LOOH zu einer Erhöhung der Katalase-Aktivität.

Auch die SOD-Aktivität wurde in HT29 Zellen durch Behandlung von 150µM α-Tocopherol leicht erhöht. Stärker ins Gewicht fällt die Beobachtung, dass α-Tocopherol den LOOH-induzierten Verbrauch an SOD Aktivität verhindern konnte. Meine Ergebnisse belegen daher eine Schutzwirkung von α-Tocopherol gegenüber LOOH in der Karzinomzelllinie HT29. Bei LT97-2 war die Modulation der SOD-Aktivität deutlich weniger ausgeprägt. Es zeigte sich nur eine leichte Erhöhung der SOD-Aktivität bei Behandlung mit 50µM α-Tocopherol.

Insgesamt zeigen meine Ergebnisse, dass sowohl Katalase als auch SOD in HT29 Zellen durch α -Tocopherol Behandlung in ihrer Aktivität unterstützt werden und weiteren Schutz vor LOOH bieten. LT97-2 und LT97-3 Zellen zeigten im Vergleich zu HT29 gegensätzliche Katalase- und SOD-Aktivitäten. Dies könnte auf Veränderungen der Genexpression und auf eine Überproduktion von ROS zurückzuführen sein (Klaunig et al., 1998).

5.2 Wirkung der Tocopherole auf Genexpression

5.2.1 Hemmung der Tocopherole auf die COX-2 Expression

COX-2 Expression spielt eine wichtige Rolle im Arachidonsäuremetabolismus, im speziellen in der Prostaglandin-Produktion (Gupta und Dubois, 2001). Eine erhöhte Aufnahme bzw. eine erhöhte Syntheserate der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure erhöht die Bildung freier Radikale durch Lipidperoxidationen. Jurek et al. konnte eine Erhöhung der COX-2 Genexpression durch LOOH bei LT97 und SW480 verzeichnen (Jurek et al., 2005). γ -Tocopherol ist im Stande über Inhibierung der Phospholipase A₂-Aktivität die Prostaglandin E₂-Produktion zu unterdrücken und die COX-2 Aktivität zu inhibieren (Jiang et al., 2000).

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass α - und γ -Tocopherol bei der Zelllinie HT29 die Expression der COX-2-mRNA bei LOOH-Behandlung signifikant hemmen konnte. γ -Tocopherol hatte einen noch höheren Effekt in der Hemmung der COX-2 Expression und erwies einen höheren Schutzeffekt vor LOOH. Bei der Zelllinie LT97-3 konnte ebenfalls bei 3h LOOH-Behandlung ein hoher Schutzeffekt der beiden Tocopherole verzeichnet werden.

Auf Produktebene mittels Prostaglandin-Elisa konnte nur bei LOOH behandelten Zellen Prostaglandin E₂ nachgewiesen werden. Bei LOOH unbehandelten Zellen bzw. Tocopherol behandelten Zellen lag PGE₂ unter der Nachweisgrenze. Bei LT97-3 Zellen konnte ein Schutzeffekt durch γ -Tocopherol gegenüber LOOH gezeigt werden. Unsere Ergebnisse zeigen einen Schutzeffekt von γ -Tocopherole bei LOOH-Behandlung in der Adenomzelllinie LT3 sowohl durch Hemmung der COX-2 Genexpression als auch durch Hemmung der PGE₂-Synthese. Somit unterstützen unsere Ergebnisse die in der Literatur beschriebenen Effekte und zeigen auf, dass die COX-2 vermittelte Prostaglandinsynthese durch γ -Tocopherol gehemmt werden konnte (Jiang et al., 2000), (Jurek et al., 2005).

5.2.2 Schutzwirkung der Tocopherole auf die VEGF-Expression

Durch Lipidperoxidation und die damit erhöhte Prostaglandin-Produktion wird die VEGF-Expression stimuliert. Somit sind Fettsäurehydroperoxide maßgeblich an einer erhöhten

VEGF-Expression und der damit verbundenen erhöhten Wachstumsinduktion und Angiogenese beteiligt (Jurek, 2003). Jurek et al. konnte in den beiden Zelllinien SW480 und LT97 eine Hochregulation von VEGF durch LOOH erzielen (Jurek et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Studie belegen nun eine Abmilderung der VEGF-Expression in der Zelllinie HT29 bei 3h LOOH-Einwirkung durch gleichzeitige Gabe von γ -Tocopherol. Bei der Zelllinie LT97-3 konnte α -Tocopherol bei 3h LOOH-Einwirkung eine höchst signifikante Schutzwirkung bewirken, während γ -Tocopherol in der Kombination eine Erhöhung der Expression bewirkte.

Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass α -Tocopherol der HT29 Zellen einen schützenden Effekt gegenüber LOOH bietet. LT97-3 Zellen konnten keinen schützenden Effekt gegenüber LOOH zeigen, jedoch konnte die alleinige γ -Tocopherol-Behandlung eine Erniedrigung der VEGF-Protein-Expression bewirken.

Beide Tocopherole konnten Schutzeffekte gegenüber der LOOH induzierten VEGF Expression bieten. Die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpression wiesen unterschiedliche Schutzwirkungen auf. Die Schutzwirkung durch α -Tocopherol bei LT97-3 Zellen ist für weitere krebspräventive Studien von Interesse.

5.2.3 Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt in Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle indem er COX-2 transkribiert und somit die weitere Prostaglandinsynthese mitreguliert (Karin et al., 2002).

Die Hemmwirkung der Tocopherole auf die Aktivierung von NF- κ B wurde mittels des Luciferase Assays untersucht. Bei 24h Behandlung der HT29 Zellen mit LOOH konnte α -Tocopherol eine schützende Wirkung erzielen. Dieses Forschungsergebnis unterstützt die Daten anderer in vivo und in vitro Studien in welchen durch Tocopherol-Behandlung die NF- κ B-Aktivierung ebenfalls gehemmt werden konnte (Crispen et al., 2007), (Calfree-Mason et al., 2004).

Die zusammengefassten Ergebnisse meiner Forschungsarbeit zeigen eine protektive Wirkung im Entzündungssignalweg durch α -Tocopherol bei HT29, da die COX-2-Expression und die VEGF-Protein-Expression ebenfalls durch α -Tocopherol gehemmt werden konnten.

5.3 Schlussbetrachtung:

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden die Schutzwirkungen der α - und γ -Tocopherole auf LOOH induzierten oxidativen Stress in kolorektalen Tumorzellen in vitro untersucht. Es zeigten sich sowohl in der Karzinomzelllinie HT29 als auch in den Adenomzelllinien LT97-2 und LT97-3 antioxidative Wirkungen gegenüber ROS. Sowohl die direkte Hemmung der durch LOOH verursachten H_2O_2 -Bildung als auch die unterstützende Funktion antioxidativer Enzyme konnten durch Tocopherol-Behandlung aufgezeigt werden. Die Genexpression von COX-2 und VEGF, welche in der Tumorpromotion und Progression eine entzündungsfördernde und angiogenetische Wirkung erzielen, konnte durch die schützende Wirkung der Tocopherole bei LOOH-Behandlung gehemmt werden. Dieser Schutzeffekt konnte bei VEGF auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die NF- κ B-Aktivität, welche eine fördernde Wirkung in Entzündungsprozessen und weiterer Aktivierung von VEGF besitzt, konnte durch α -Tocopherol gehemmt werden.

Diese Resultate zeigen ein großes antioxidatives Wirkungsspektrum der α - und γ -Tocopherole in Karzinom- und Adenomzelllinien. In den Adenomzelllinien konnten die Tocopherole die durch Lipidperoxidation induzierte weitere Radikalbildung hemmen. Ebenfalls konnte auf Genexpressionsniveau eine Hemmung von COX-2 und VEGF verzeichnet werden. Aus diesem Grund eignen sich α - und γ -Tocopherole für weitere Untersuchungen in der Krebsprävention.

α -Tocopherol ist im Vergleich zu γ -Tocopherol die häufigere Form von Vitamin E im menschlichen und tierischen Gewebe und Blutplasma, dies ist auf die unterschiedliche Bioverfügbarkeit und Bioaktivität zurückzuführen (Jiang et al., 2001), (Behrens and Madere, 1987). Für weitere Studienzwecke wären in vivo Studien mit Rücksichtnahme auf den unterschiedlichen Tocopherolmetabolismus eine geeignete weitere Vorgehensweise.

6 Literaturverzeichnis

- AMES, B. N., GOLD, L. S. & WILLETT, W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5258-65.
- ASPINALL & TAYLOR-ROBINSON 2001. Multistep Model of carcinogenesis. The stepwise genetic alterations that lead to colorectal cancer. *Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition*. © 2003 by Saunders, an imprint of Elsevier.
- AUSTRIA, S. 2011. *Statistik Austria* [Online]. Available: (http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_ennddarm/index.html).
- BARKER, N., VAN ES, J. H., KUIPERS, J., KUJALA, P., VAN DEN BORN, M., COZIJNSEN, M., HAEGEBARTH, A., KORVING, J., BEGTHEL, H., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449, 1003-7.
- BARTSCH, H. & NAIR, J. 2004. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect Prev*, 28, 385-91.
- BARTSCH, H., NAIR, J. & OWEN, R. W. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 20, 2209-18.
- BASTIDE, N. M., PIERRE, F. H. & CORPET, D. E. 2011. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 177-84.
- BEDI, A., PASRICHA, P. J., AKHTAR, A. J., BARBER, J. P., BEDI, G. C., GIARDIELLO, F. M., ZEHNBAUER, B. A., HAMILTON, S. R. & JONES, R. J. 1995. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res*, 55, 1811-6.
- BEHRENS, W. A. & MADERE, R. 1987. Mechanisms of absorption, transport and tissue uptake of RRR-alpha-tocopherol and d-gamma-tocopherol in the white rat. *J Nutr*, 117, 1562-9.

- BIANCHINI, F., KAAKS, R. & VAINIO, H. 2002. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*, 3, 565-74.
- BINGHAM, S. A., PIGNATELLI, B., POLLOCK, J. R., ELLUL, A., MALAVEILLE, C., GROSS, G., RUNSWICK, S., CUMMINGS, J. H. & O'NEILL, I. K. 1996. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*, 17, 515-23.
- BLACK, A. T., GRAY, J. P., SHAKARJIAN, M. P., MISHIN, V., LASKIN, D. L., HECK, D. E. & LASKIN, J. D. 2008. UVB light upregulates prostaglandin synthases and prostaglandin receptors in mouse keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 232, 14-24.
- BOYLE, P. & LEVIN, B. 2008. World Cancer Report.
- BREEN, A. P. & MURPHY, J. A. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*, 18, 1033-77.
- CALFEE-MASON, K. G., SPEAR, B. T. & GLAUERT, H. P. 2004. Effects of vitamin E on the NF-kappaB pathway in rats treated with the peroxisome proliferator, ciprofibrate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199, 1-9.
- CALLE, E. E., MIRACLE-MCMAHILL, H. L., THUN, M. J. & HEATH, C. W., JR. 1995. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 87, 517-23.
- CALLE, E. E. & THUN, M. J. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene*, 23, 6365-78.
- CAMPBELL, S., STONE, W., WHALEY, S. & KRISHNAN, K. 2003. Development of gamma ([gamma])-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 47, 249-259.
- CAPDEVILA, J. H., FALCK, J. R. & ESTABROOK, R. W. 1992. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J*, 6, 731-6.
- CARO, A. A. & CEDERBAUM, A. I. 2006. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 40, 364-75.
- CENTER, M. M., JEMAL, A., SMITH, R. A. & WARD, E. 2009. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 59, 366-78.
- COHEN, T., NAHARI, D., CEREM, L. W., NEUFELD, G. & LEVI, B. Z. 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271, 736-41.

- CORPET, D. E. 2011. Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*, In Press, Corrected Proof.
- CRISPEN, P. L., UZZO, R. G., GOLOVINE, K., MAKHOV, P., POLLACK, A., HORWITZ, E. M., GREENBERG, R. E. & KOLENKO, V. M. 2007. Vitamin E succinate inhibits NF-kappaB and prevents the development of a metastatic phenotype in prostate cancer cells: implications for chemoprevention. *Prostate*, 67, 582-90.
- DENNY, L. 2005. REVIEW: The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112, 1204-1212.
- DEROANNE, C. F., HAJITOU, A., CALBERG-BACQ, C. M., NUSGENS, B. V. & LAPIERE, C. M. 1997. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*, 57, 5590-7.
- DESCHNER, E. E. & LIPKIN, M. 1975. Proliferative patterns in colonic mucosa in familial polyposis. *Cancer*, 35, 413-8.
- DICKSON, R. B., THOMPSON, E. W. & LIPPMAN, M. E. 1990. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37, 305-16.
- DIMBERG, J., SAMUELSSON, A., HUGANDER, A. & SODERKVIST, P. 1999. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut*, 45, 730-2.
- DING, X. Z., HENNIG, R. & ADRIAN, T. E. 2003. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 2, 10.
- EBERHART, C. E. & DUBOIS, R. N. 1995. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 109, 285-301.
- FEARON, E. R. & VOGELSTEIN, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- FINKENZELLER, G., SPARACIO, A., TECHNAU, A., MARME, D. & SIEMEISTER, G. 1997. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*, 15, 669-76.

- FRANK, S., HUBNER, G., BREIER, G., LONGAKER, M. T., GREENHALGH, D. G. & WERNER, S. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 270, 12607-13.
- GIOVANNUCCI, E., ASCHERIO, A., RIMM, E. B., COLDITZ, G. A., STAMPFER, M. J. & WILLETT, W. C. 1995. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med*, 122, 327-34.
- GLEI, M., KLENOW, S., SAUER, J., WEGEWITZ, U., RICHTER, K. & POOL-ZOBEL, B. L. 2006. Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res*, 594, 162-71.
- GOAD, D. L., RUBIN, J., WANG, H., TASHJIAN, A. H., JR. & PATTERSON, C. 1996. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 137, 2262-8.
- GRADY, W. M. & CARETHERS, J. M. 2008. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135, 1079-99.
- GUPTA, R. A. & DUBOIS, R. N. 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*, 1, 11-21.
- HAIDINGER, G., WALDHOER, T., HACKL, M. & VUTUC, C. 2006. Survival of patients with colorectal cancer in Austria by sex, age, and stage. *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift*, 156, 549-551.
- HALLIWELL, B. & ARUOMA, O. I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 281, 9-19.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HICKLIN, D. J. & ELLIS, L. M. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23, 1011-27.
- HOCKENBERY, D. M., ZUTTER, M., HICKEY, W., NAHM, M. & KORSMEYER, S. J. 1991. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6961-5.

- HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M. S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM, A. T. & DE BRUIJN, E. A. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 56, 549-80.
- HUMPHRIES, A. & WRIGHT, N. A. 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 8, 415-24.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- JIANG, Q., CHRISTEN, S., SHIGENAGA, M. K. & AMES, B. N. 2001. gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr*, 74, 714-22.
- JIANG, Q., ELSON-SCHWAB, I., COURTEMANCHE, C. & AMES, B. N. 2000. gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11494-9.
- JUREK, D. 2003. *Wirkung von tumorpromovierenden Substanzen in Zellkulturmodellen des Kolons*. Dr. rer. nat., Formal- und Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien.
- JUREK, D., UDILOVA, N., JOZKOWICZ, A., NOHL, H., MARIAN, B. & SCHULTE-HERMANN, R. 2005. Dietary lipid hydroperoxides induce expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human colorectal tumor cells. *Faseb J*, 19, 97-9.
- KAM, P. C. A. & SEE, A. U.-L. 2000. Cyclo-oxygenase isoenzymes: Physiological and pharmacological role. *Anaesthesia*.
- KAMAL-ELDIN, A. & APPELQVIST, L. A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- KARIN, M., CAO, Y., GRETEN, F. R. & LI, Z. W. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2, 301-10.
- KARNER-HANUSCH, J. & MARIAN, B. 2006. [Aspects of gender in colorectal tumors]. *Wien Med Wochenschr*, 156, 541-4.
- KHANDWALA, H. M., MCCUTCHEON, I. E., FLYVBJERG, A. & FRIEND, K. E. 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev*, 21, 215-44.

- KIM, K. B. & LEE, B. M. 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett*, 113, 205-12.
- KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-70.
- KLAUNIG, J. E., XU, Y., ISENBERG, J. S., BACHOWSKI, S., KOLAJA, K. L., JIANG, J., STEVENSON, D. E. & WALBORG, E. F., JR. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 1, 289-95.
- KORSMEYER, S. J. 1992. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80, 879-86.
- LEITNER, B. 2009. Statistik Austria - Jahrbuch der Gesundheitsstatistik. *Statistik Austria*.
- LI, J., PERRELLA, M. A., TSAI, J. C., YET, S. F., HSIEH, C. M., YOSHIZUMI, M., PATTERSON, C., ENDEGE, W. O., ZHOU, F. & LEE, M. E. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 270, 308-12.
- LIPKIN, M. 1974. Phase 1 and phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in diseases leading to colonic cancer. *Cancer*, 34, suppl:878-88.
- LIU, J. F. & HUANG, C. J. 1996. Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. *J Nutr*, 126, 2227-35.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL, J. (eds.) 2000. *Molecular Cell Biology*, New York: W.H. Freeman.
- LUEBECK, E. G. & MOOLGAVKAR, S. H. 2002. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15095-100.
- MARIAN, B. 1996. How Does Diet Contribute to Colon Cancer Development? *Onkologie*, 19, 132-139.
- MARIAN, B. (ed.) 2011. *Genetische und biologische Grundlagen der Krebsentstehung. In: Krankheit, Krankheitsursachen und -bilder (Brigitte Marian,HG.). Facultas Verlags- und Buchhandels AG;260-275.*
- NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S. & POLTORAK, Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13, 9-22.

- NISHIKAWA, M., HASHIDA, M. & TAKAKURA, Y. 2009. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 319-26.
- NOR, J. E., CHRISTENSEN, J., MOONEY, D. J. & POLVERINI, P. J. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol*, 154, 375-84.
- PERTOVAARA, L., KAIPAINEN, A., MUSTONEN, T., ORPANA, A., FERRARA, N., SAKSELA, O. & ALITALO, K. 1994. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, 269, 6271-4.
- PIERRE, F. H., MARTIN, O. C., SANTARELLI, R. L., TACHE, S., NAUD, N., GUERAUD, F., AUDEBERT, M., DUPUY, J., MEUNIER, N., ATTAIX, D., VENDEUVRE, J. L., MIRVISH, S. S., KUHNLE, G. C., CANO, N. & CORPET, D. E. 2013. Calcium and alpha-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *Am J Clin Nutr*.
- PITT, A. R. & SPICKETT, C. M. 2008. Mass spectrometric analysis of HOCl- and free-radical-induced damage to lipids and proteins. *Biochem Soc Trans*, 36, 1077-82.
- POTTER, J. D. 1999. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, 91, 916-32.
- PRESTON, S. L., WONG, W. M., CHAN, A. O., POULSOM, R., JEFFERY, R., GOODLAD, R. A., MANDIR, N., ELIA, G., NOVELLI, M., BODMER, W. F., TOMLINSON, I. P. & WRIGHT, N. A. 2003. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res*, 63, 3819-25.
- REHMAN, M. U., BUTTAR, Q. M., KHAWAJA, M. I. & KHAWAJA, M. R. 2009. An impending cancer crisis in developing countries: are we ready for the challenge? *Asian Pac J Cancer Prev*, 10, 719-20.
- RICHTER, M., JUREK, D., WRBA, F., KASERER, K., WURZER, G., KARNER-HANUSCH, J. & MARIAN, B. 2002. Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer*, 38, 1937-45.
- RYUTO, M., ONO, M., IZUMI, H., YOSHIDA, S., WEICH, H. A., KOHNO, K. & KUWANO, M. 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor

- necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem*, 271, 28220-8.
- SCHULTE-HERMANN, R., MARIAN, B., BURSCH, W. & GRASL-KRAUPP, B. (eds.) 2004. *Tumorpromotion. In: Lehrbuch der Toxikologie (H. Marquardt und S. Schäfer, Hrsg.). Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2, 2004; 195-242.*
- SHIH, I. M., WANG, T. L., TRAVERSO, G., ROMANS, K., HAMILTON, S. R., BEN-SASSON, S., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 2001. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2640-5.
- STONE, W. L. & PAPAS, A. M. 1997. Tocopherols and the Etiology of Colon Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 1006-1014.
- SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K., NAKAGAMA, H. & NAGAO, M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci*, 95, 290-9.
- VENKATESAN, B., MAHIMAINATHAN, L., DAS, F., GHOSH-CHOUDHURY, N. & GHOSH CHOUDHURY, G. 2007. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells. *J Cell Physiol*, 211, 457-67.
- VINCENT, T. L. & GATENBY, R. A. 2008. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol*, 32, 729-37.
- VULCAIN, E., GOUPY, P., CARIS-VEYRAT, C. & DANGLES, O. 2005. Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radic Res*, 39, 547-63.
- WAGNER, B. A., BUETTNER, G. R. & BURNS, C. P. 1994. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, 33, 4449-53.
- WEI, E. K., GIOVANNUCCI, E., WU, K., ROSNER, B., FUCHS, C. S., WILLETT, W. C. & COLDITZ, G. A. 2004. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer*, 108, 433-42.
- WEINBERG, R. A. (ed.) 2007. *The Biology of Cancer*: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- WILLETT, W. C. 2000. Diet and cancer. *Oncologist*, 5, 393-404.

- YANG, C. S., LU, G., JU, J. & LI, G. X. 2010. Inhibition of inflammation and carcinogenesis in the lung and colon by tocopherols. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203, 29-34.
- YOUNES, M. (ed.) 2004. *Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies*. In: *Lehrbuch der Toxikologie*. (H. Marquardt und S. Schäfer, Hrsg.). Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2, 2004.
- ZIELONKE, N. 2012. Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neuerkrankungen und Sterberate der häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen in industrialisierten Ländern und Entwicklungsländern (Boyle und Levin, 2008).	1
Abb. 2: Inzidenz und Mortalität der häufigsten Krebserkrankungen bei Männern in industrialisierten Ländern und Entwicklungsländern (Boyle und Levin, 2008).	2
Abb. 3: Häufigste Tumorlokalisationen nach Geschlecht (Statistik Austria, 2011) (http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/krebsinzidenz_im_ueberblick/index.html).....	3
Abb. 4: Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms weltweit (Statistik Austria 2011) (http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html).....	4
Abb. 5: Geschlechtsverteilung, Altersverteilung und altersspezifische Inzidenz und Mortalität des Kolonkarzinoms in Österreich (Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich, 2012)(Zielonke N. (Statistik Austria, 2012).....	5
Abb. 6: Mehrstufenprozess der Kanzerogenese (Schulte-Hermann et al., 2004).	7
Abb. 7: Die Phasen der Initiation, Promotion und Progression (Vincent und Gatenby, 2008).....	9
Abb. 8: „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan und Weinberg, 2000).	10
Abb. 9: Normale, hyperplastische und abberante Krypte (Schulte-Hermann et al., 2004).....	12
Abb. 10: Mehrstufenprozess der Kanzerogenese. Schrittweise genetische Veränderungen führen zu einem kolorektalen Karzinom (Aspinall und Taylor-Robinson, 2001).	13
Abb. 11 Top-down Hypothese (Shih et al., 2001).	14

Abb. 12 Die Top-down Hypothese anhand von Hämatoxilin und Eosin gefärbten adenomatösen (A,B) und normalen Gewebe der Darmschleimhaut (C) (Shih et al., 2001).....	14
Abb. 13 Der Cyclooxygenaseweg des Arachidonsäuremetabolismus (Black et al., 2008).	18
Abb. 14: Die Rolle des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors und dessen Rezeptoren in der Angiogenese (Hicklin und Ellis, 2005).....	20
Abb. 15: Oxidativer Stress in akuter und chronischer Ausprägung im Zusammenhang mit Initiation, Promotion und Progression (Klaunig et al., 1998).....	21
Abb. 16 : Das Prinzip des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (www.motifolio.com/6111179.html).	31
Abb. 17: Prinzip der Real-Time PCR (www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001).	34
Abb. 18: Transfektion der Vektoren und anschließender Luciferase Assay (http://www.promega.com/uk/products/dual-luciferase.htm).	40
Abb. 19: Firefly und Renilla Luciferase katalysieren biolumineszente Reaktionen (www.biolab.cn/plus/view-241598-1.html)	40
Abb.20: Zellviabilität nach 24h α -Tocopherol Behandlung der Zelllinien HT29 und LT97-3.....	45
Abb. 21 a-c: DCF-FACS-Analyse nach 15-minütiger H_2O_2 -Behandlung der 3 Zelllinien.	46
Abb. 22: H_2O_2 -Bildung nach 24h 50 μ M α -Tocopherol Behandlung und anschließender 1,5-stündiger 20 μ M LOOH Inkubation der Zelllinie HT29.	47
Abb. 23: H_2O_2 -Bildung der HT29 Zellen mit 24h 50 μ M α -und γ -Tocopherol Behandlung und anschließender 1,5-stündiger 20 μ M LOOH-Behandlung.....	48
Abb. 24: H_2O_2 -Bildung der LT97-2 Zellen mit 24h α -Tocopherol und anschließender 1,5-stündiger 20 μ M LOOH-Behandlung.	48
Abb. 25: H_2O_2 -Bildung nach 24-stündiger Behandlung mit α -und γ -Tocopherol und anschließender LOOH Zugabe der LT97-2-Zelllinie.....	49

Abb. 26: Viabilität nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Hämatin-Konzentrationen der Zelllinien HT29,LT97-2 und LT97-3.....	50
Abb. 27: H ₂ O ₂ -Bildung nach 24h Behandlung mit α -Tocopherol und anschließender 1,5-stündiger 5 und 20 μ M Hämatininkubation bei HT29.....	51
Abb. 28 H ₂ O ₂ -Bildung der LT97-3 nach 24h α -Tocopherol Behandlung und anschließender 1,5-stündiger Hämatininkubation.....	52
Abb. 29: COX-2-mRNA Expression in HT29 Zellen bei 24-stündiger 50 μ M α -und γ -Tocopherol Behandlung mit 3h und 6h LOOH Einwirkung.....	53
Abb. 30: COX-2 mRNA Expression in LT97-3 Zellen bei 24-stündiger 50 μ M α -und γ -Tocopherol Behandlung mit 3h und 6h LOOH Einwirkung.....	54
Abb. 31 : VEGF-mRNA Expression in HT29 Zellen bei 24-stündiger 50 μ M α -und γ -Tocopherol-Behandlung mit 3h und 6h LOOH Einwirkung.....	55
Abb. 32:: VEGF-mRNA Expression in LT97-3 Zellen bei 24-stündiger 50 μ M α -und γ -Tocopherol-Behandlung mit 3h und 6h LOOH Einwirkung.....	55
Abb. 33: Ausoptimierung verschiedener unbehandelter HT29-Samplengenen für die Katalase Aktivitätsmessung.	56
Abb. 34: Katalase Aktivität bei HT 29 nach 24-stündiger 50 μ M α -Tocopherol-Behandlung.....	56
Abb. 35: LOOH-Zeitkurve bei HT 29 mit unterschiedlichen Samplengenen.....	57
Abb. 36 a, b, c: Katalase Aktivität bei 3 Zelllinien mit unterschiedlichen Tocopherolkonzentrationen.....	58
Abb. 37 : Katalase Aktivität der Zelllinie HT29 bei 24-stündiger 100 μ M α -Tocopherol-Behandlung und 2-stündiger 20 μ M LOOH Einwirkung.....	59
Abb. 38: Katalase Aktivität der Zelllinie LT97-2 bei 24-stündiger 50 μ M α -Tocopherol-Behandlung und anschließender 2-stündiger 20 μ M LOOH Einwirkung.....	59
Abb. 39: Katalase Aktivität der Zelllinie LT97-3 bei 24-stündiger 50 μ M α -Tocopherol-Behandlung und anschließender 2-stündiger LOOH Einwirkung.	60

Abb. 40: LOOH-Zeitkurve mit 3 Zelllinien und unterschiedlichen Einwirkzeiten von 20µM LOOH bei Messung der SOD Aktivität.	60
Abb. 41: Ausoptimierung bei 3 Zelllinien mit 50µM und 100µM α-Tocopherol-Behandlung.....	61
Abb. 42: SOD Aktivität der Zelllinie HT 29 bei 24-stündiger 100µM und 150µM α-Tocopherol-Behandlung und anschließender 0,5-stündiger LOOH Einwirkung.....	62
Abb. 43: Superoxiddismutase Aktivität der Zelllinie LT97-2 bei 24-stündiger 50µM α-Tocopherol-Behandlung und anschließender 1-stündiger LOOH Einwirkung.....	62
Abb. 44: NF-κB-Expression der Zelllinie HT 29 bei 24-stündiger 50µM α-und γ-Tocopherol Behandlung und anschließender 24-stündiger LOOH Inkubation.....	63
Abb. 45: NF-κB-Expression der Zelllinie HT 29 bei 6-stündiger 50µM α-und γ-Tocopherol Behandlung und anschließender 6-stündiger LOOH Inkubation.....	64
Abb. 46: Produktion von PGE2 in der Zelllinie HT29.	65
Abb. 47 Produktion von PGE 2 in der Zelllinie LT97-3.....	65
Abb. 48: Protein Expression von VEGF bei HT 29.	66
Abb. 49: Protein Expression von VEGF in der Zelllinie LT97-3	67

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mengenangaben der verwendeten Reagenzien	33
Tab. 2 : Liste der Taqman-Proben.....	35
Tab. 3 : Volumina der Arbeitslösungen für die Proben und Leerwerte.	36
Tab. 4 : Volumina der Arbeitsreagenzien	43

9 Curriculum Vitae

Persönliche Details:

Name: Andrea Majer
Geburtsdatum: 10.März 1985
Geburtsort: Wien

Ausbildung:

seit 2003 Studium der Biologie, Spezialisierung Anthropologie/Humangenetik
an der Universität Wien
2003 Matura Haizingergasse
1997-2003 Haizingergasse, Wien
1995-1996 Albertus Magnus Schule, Wien
1991-1994 Albertus Magnus Schule, Wien

Arbeitserfahrung:

2012/13 Café Wannenmacher
3-6/2012 Dialog Gentechnik: Projektdurchführungen an Kindergärten
2010-12 Assistenz bei Dr. Elisabeth Zehetner und Dr. Hermine Obermair:
Fachärztinnen für Lungen- und Bronchialheilkunde Aufgabengebiet:
Lungenfunktionstests, Prick-Tests, Untersuchungsauswertungen
7/2009 Praktikum St.Anna Kinderspital
2008-2010 Initiative Venengesundheit: Venenfunktionsmessungen
2007-2009 Naturhistorisches Museum Wien: Inventarisierung von Sammlungen

