

Einfluss kurzkettiger Fettsäuren und mikrobieller Fermentationsprodukte neuartiger Oligosaccharide auf Cytotoxizität, Proliferation und Apoptose von humanen Coloncancer-Zelllinien

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Universität Hohenheim

und

Institut für Ernährungsphysiologie
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe

vorgelegt von
Silvia Andrea Roser

aus Pforzheim

2005

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Rechkemmer
2. berichtende Person: Prof. Dr. med. Hans Konrad Biesalski
Eingereicht am: 30.06.2005
Mündliche Prüfung am: 09.01.2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 23.11.2005 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und unter Verwendung der angegebenen Quellen erstellt wurde.

Pforzheim, den 29.06.2005

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS	III
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
III	TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	1
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	Mikrobielle Fermentation im Dickdarm	5
2.1.1	Mikrobielle Besiedelung des Gastrointestinaltrakts.....	5
2.1.2	Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) als Endprodukte bakterieller Fermentationsprozesse	7
2.1.2.1	Definition SCFA	7
2.1.2.2	Bildung und Konzentrationen der SCFA	7
2.1.2.3	Absorption und Stoffwechsel der SCFA	9
2.1.2.4	Rolle der SCFA bei Dickdarmkrebs.....	11
2.2	Darmkrebs	12
2.2.1	Epidemiologische Daten	12
2.2.2	Beteiligte Gene	13
2.2.3	Einflussfaktoren.....	14
2.2.4	Entstehung	15
2.2.4.1	Adenom-Carcinom-Sequenz	15
2.2.4.2	APC-Gen, Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP).....	15
2.2.5	Apoptose.....	16
2.2.6	Caspasen	17
2.2.6.1	Apoptose im Gastrointestinaltrakt.....	17
2.2.7	Zellzyklus	19
2.3	Ballaststoffe.....	20
2.3.1	Funktionelle Kohlenhydrate	22

2.4	Zielsetzung	25
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Material.....	27
3.1.1	Geräte.....	27
3.1.2	Software.....	28
3.1.3	Chemikalien, Zellkulturmedien und –zusätze.....	28
3.1.4	Verbrauchsmaterial.....	30
3.1.5	Zelllinien.....	31
3.1.6	Oligosaccharide	31
3.1.7	Lösungen	32
3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Gewinnung der Fermentationsüberstände.....	35
3.2.2	Analyse der Fermentationsüberstände	36
3.2.3	Herstellen der WST-1-Gebrauchslösung.....	36
3.2.4	Routine-Zellkultur	36
3.2.5	Zellzählungen und Vitalitätsbestimmungen.....	37
3.2.6	Cytotoxizität	38
3.2.7	Proliferation.....	39
3.2.8	Apoptose.....	40
3.2.8.1	Annexin V	40
3.2.8.2	Caspase-3	41
3.2.9	Zellzyklus	42
3.2.10	Messung am Durchflusscytometer.....	42
3.2.11	Elektrophysiologische Untersuchungen in vertikalen Diffusionskammern (Ussing-Kammern).....	44
3.2.12	Statistik	46
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	SCFA-Konzentrationen der FÜ.....	47
4.2	Cytotoxizität.....	49
4.2.1	HT29.....	49
4.2.1.1	Originalsubstanzen.....	49
4.2.1.2	Fermentationsüberstände und SCFA-Gemische.....	50
4.2.2	HT29 Clon 19A	52
4.2.2.1	Fermentationsüberstände und SCFA-Gemische.....	52

I Inhaltsverzeichnis	III
4.2.3 T84.....	54
4.2.4 Vergleich der Zelllinien.....	55
4.3 Proliferation.....	57
4.3.1 HT29.....	57
4.3.2 HT29 Clon 19A.....	59
4.3.3 T84.....	61
4.3.4 Vergleich der Zelllinien.....	63
4.4 Apoptose.....	65
4.4.1 HT29.....	66
4.4.2 HT29 Clon 19A.....	66
4.4.3 T84.....	67
4.4.4 Vergleich der Zelllinien.....	68
4.4.4.1 Negativ- und Positiv-Kontrolle.....	68
4.4.4.2 FÜ / SCFA-Gemisch „Kontrolle“.....	69
4.4.4.3 FÜ / SCFA-Gemisch BC-O 165.....	69
4.4.4.4 FÜ / SCFA-Gemisch BC-O 299.....	69
4.4.4.5 FÜ / SCFA-Gemisch BC-P 114.....	69
4.5 Zellzyklus.....	70
4.5.1 HT29.....	70
4.5.2 HT29 Clon 19A.....	71
4.5.3 T84.....	72
4.6 Ussing-Kammern.....	73
5 DISKUSSION.....	75
5.1 In vitro-Fermentation von Oligosacchariden mit Humanfaeces.....	75
5.2 Etablierung eines Methodenpanels für das <i>In vitro</i>-Screening neu entwickelter präbiotisch wirksamer Oligosaccharide.....	76
5.3 Cytotoxizität der Fermentationsüberstände und SCFA-Gemische.....	77
5.4 Proliferation.....	78
5.5 Apoptose.....	79
5.5.1 Zellzyklus.....	80
5.5.2 Elektrophysiologische Untersuchungen in Ussing-Kammern.....	82

5.6	HT29, HT29 Clon 19A und T84: Colocarcinom-Zelllinien mit unterschiedlichen Differenzierungsmöglichkeiten und ihre Verwendung für <i>In vitro</i>-Versuche.....	83
5.7	Perspektiven.....	84
6	LITERATUR.....	86
7	TABELLENANHANG.....	94
	LEBENS LAUF.....	99
	DANKSAGUNG.....	101

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stoffwechselwege bakterieller Kohlenhydratvergahrung im Colon (Beispiele)	9
Abb. 2: Adenom-Carcinom-Sequenz	15
Abb. 3: Morphologie und Zellhierarchie einer Colorkrypte	18
Abb. 4: Zellzyklusphasen mit in der jeweiligen Phase synthetisierten Zellzyklusproteinen	19
Abb. 5: Enzymatische Umwandlung von Saccharose in Isomaltulose	23
Abb. 6: Schematische Darstellung eines Zell-Monolayers nach Kultivierung der Zellen auf permeablen Membranen, z. B. Snapwells	45
Abb. 7: Vitalitätsraten von HT29-Zellen nach Inkubation mit OS in verschiedenen Konzentrationen	49
Abb. 8: Vitalitätsraten von HT29-Zellen nach Inkubation mit FÜ / SCFA BC-O 165	51
Abb. 9: Vergleich der Vitalitätsraten von HT29-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %	51
Abb. 10: Vitalitätsraten von HT29 Clon 19A-Zellen nach Inkubation mit FÜ / SCFA BC-O 165	52
Abb. 11: Vergleich der Vitalitätsraten von HT29 Clon 19A-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 10 %	53
Abb. 12: Vitalitätsraten von T84-Zellen nach Inkubation mit FÜ / SCFA BC-O 165	54
Abb. 13: Vergleich der Vitalitätsraten von T84-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %	55
Abb. 14a: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit verschiedenen FÜ	58
Abb. 14b: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen	58
Abb. 15a: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29 Clon 19A-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit verschiedenen FÜ	60
Abb. 15b: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29 Clon 19A-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen	60
Abb. 16a: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von T84-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit verschiedenen FÜ	62
Abb. 16b: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von T84-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen	62
Abb. 17: Annexin V/PI-gefärbte HT29-Zellen im Dot-Plot	65
Abb. 18: Apoptoserate bei HT29-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %	66
Abb. 19: Apoptoserate bei HT29 Clon 19A-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen	67

Abb. 20: Apoptoserate bei T84-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen.....	68
Abb. 21: Prozentuale Anteile von HT29-Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen.....	71
Abb. 22: Prozentuale Anteile von HT29 Clon 19A-Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen.....	72
Abb. 23: Prozentuale Anteile von T84-Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen.....	73
Abb. 24: Messung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) in Ussing-Kammern bei HT29 Clon 19A-Zellen nach Perfusion mit verschiedenen FÜ und Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) als Positiv-Kontrolle.....	74
Abb. 25: Messung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) in Ussing-Kammern bei HT29 Clon 19A-Zellen nach Perfusion mit analogen SCFA-Gemischen und Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) als Positiv-Kontrolle.....	74

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Substanzen, die nach neuester Definition zu den Ballaststoffen gezählt werden.....	21
Tab. 2: Schema zum Versuchsverlauf des Proliferationstests.....	39
Tab. 3: SCFA-Konzentrationen verschiedener Chargen von Fermentationsüberständen	48
Tab. 4: Vergleich der Vitalitätsraten der Zelllinien HT29, HT29 Clon 19A und T84 nach 24-stündiger Inkubation mit FÜ und analogen SCFA-Gemischen.....	56
Tab. 5: Vergleich der Proliferationsraten der Zelllinien HT29, HT29 Clon 19A und T84 nach 5-tägiger Inkubation mit FÜ und analogen SCFA-Gemischen.....	64
Tab. 6: Apoptoseraten der verschiedenen Zelllinien nach Messung im Annexin V-Test und nach Messung der aktivierten Caspase-3	70
Tab. A 1: Cytotoxische Effekte der FÜ und SCFA-Gemische bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen nach 24 h Inkubation.....	94
Tab. A 2: Proliferationshemmende Effekte der FÜ und SCFA-Gemische bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen nach 5-tägiger Inkubation.....	95
Tab. A 3: Annexin V-Test: Apoptoseinduktion durch FÜ und SCFA-Gemische bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen.....	96
Tab. A 4: Aktivierte Caspase-3: Apoptoseinduktion durch FÜ und SCFA-Gemische bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen	96
Tab. A 5: Prozentuale Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M von HT29-Zellen nach Inkubation mit FÜ und SCFA-Gemischen.....	97
Tab. A 6: Prozentuale Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M von HT29 Clon 19A-Zellen nach Inkubation mit FÜ und SCFA-Gemischen	97
Tab. A 7: Prozentuale Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M von T84-Zellen nach Inkubation mit FÜ und SCFA-Gemischen.....	98

IV Abkürzungsverzeichnis

AAAC	American Association of Cereal Chemists
APC	Adenomatous Polyposis Coli Gene
AM	Anaerobiermedium
B.	Bifidobacterium
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, heute: BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung
CDK	Cyclin Dependent Kinase
DA	Deoxycholsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	Foetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FÜ	Fermentationsüberstand
FW	Faeceswasser
GC	Gaschromatographie
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
KH	Kohlenhydrat
KIP	Kinase Inhibitor Protein
L.	Lactobacillus
M.	Morbus
MCT	Monocarboxylat-Transporter
NSP	Nicht-Stärkepolysaccharide
OS	Oligosaccharide
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PE	Phycoerythrin
PgE ₂	Prostaglandin E
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PS	Polysaccharide
Pser	Phosphatidylserin
Rb	Retinoblastoma
RNase	Ribonuclease
RS	Resistente Stärke
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (Short Chain Fatty Acids)

SLC	Sodium Linked Carboxylate Transporter
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
v/v	volume per volume
Wnt	Wingless-type
w/v	weight per volume

1 Zusammenfassung / Summary

Dickdarmkrebs ist in Deutschland bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung. Die Rolle von Ballaststoffen bei der Prävention von Dickdarmkrebs bleibt umstritten: Vielversprechenden *in vitro*- und Tierexperimenten stehen widersprüchliche epidemiologische Studien gegenüber. Funktionelle Kohlenhydrate als Bestandteile präbiotischer Lebensmittel sollen die Colon-Mikroflora zu Gunsten von Bakterienstämmen verändern, die kurzkettige Fettsäuren (SCFA) bilden und deren Konzentrationen im Colon, auch im distalen Teil, wo die meisten Colone carcinome entstehen, erhöhen. SCFA, vor allem Butyrat, gelten als präventiv wirksame Substanzen gegen Dickdarmkrebs.

Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene, von der Firma Südzucker neu entwickelte, funktionelle Oligosaccharide (OS, hergestellt aus Isomaltulose und resistenter Stärke) mit Humanfaeces gesunder Probanden *in vitro* fermentiert. Die daraus gewonnenen Fermentationsüberstände (FÜ) wurden im Zellkultursystem an Colone carcinom-Zelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade (HT29, HT29 Clon 19A, T84) getestet. Untersucht wurden cytotoxische Effekte, proliferationshemmende Wirkung, Apoptoseinduktion, Einfluss auf den Zellzyklus und elektrophysiologische Parameter. Zur Anwendung kamen spektralphotometrische und durchfluscytometrische Methoden sowie Messungen in vertikalen Diffusionskammern (Ussing-Kammern). Bei allen Versuchen wurden parallel SCFA-Gemische, deren SCFA-Konzentrationen analog den FÜ waren, untersucht, außerdem ein FÜ „Kontrolle“, der ohne OS-Fermentation hergestellt wurde.

In mehreren voneinander unabhängigen Fermentationen konnten reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der SCFA-Gehalte der FÜ erzielt werden. Das Verhältnis der drei Haupt-Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat in den FÜ nach OS-Fermentation entsprach weitgehend den *in vivo*-Verhältnissen.

Die untersuchten FÜ und SCFA-Gemische wirkten in der Konzentration von 50 % bei allen Zelllinien cytotoxisch. Ebenso war eine dosisabhängige Proliferationshemmung und in der Konzentration von 50 % die Induktion von Apoptose zu verzeichnen. Durch

die parallele Untersuchung analoger SCFA-Gemische in PBS konnte gezeigt werden, dass cytotoxische und proliferationshemmende Effekte der FÜ im Wesentlichen auf ihren SCFA-Gehalt zurückzuführen sind. Für die Apoptoseinduktion konnte dies nicht bestätigt werden: Die SCFA-Gemische induzierten überwiegend mehr Apoptose als die entsprechenden FÜ. Ebenso waren die Wirkungen von FÜ und SCFA-Gemischen auf den Zellzyklus unterschiedlich: Die SCFA-Gemische konnten die DNA-Synthese-Phase zum Teil deutlich stärker hemmen als die FÜ; die FÜ führten hauptsächlich zu einem G2-Arrest. Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen in Ussing-Kammern zeigten weder FÜ noch SCFA-Gemische Effekte auf transepithelialen Widerstand oder Kurzschlussstrom.

Die Fermentationsmuster der verwendeten FÜ und die SCFA-Konzentrationen der entsprechenden Gemische unterschieden sich nicht stark genug voneinander, um in den verwendeten Testsystemen signifikant unterschiedliche Ergebnisse zu erzielen. Auch die verwendeten Zelllinien zeigten ein inkonsistentes Verhalten nach Inkubation mit FÜ bzw. SCFA-Gemischen, so dass keine Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und Wirkung der Testsubstanzen hergestellt werden konnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass aus der *in vitro*-Fermentation von OS mit Humanfaeces reproduzierbare SCFA-Muster resultieren, die den *in vivo*-Verhältnissen gleichen. Gleichzeitig wurde ein Methodenspektrum für das Screening von FÜ bzw. SCFA-Gemischen bei unterschiedlich differenzierten Colonicarcinom-Zelllinien entwickelt, das die Zellen in allen Wachstumsphasen (exponentiell, subkonfluent, konfluent, ausdifferenziertes Monolayer) erfasst. Die Wirkungen der FÜ waren allerdings nur zum Teil auf die darin enthaltenen SCFA zurückzuführen. Welche anderen FÜ-Inhaltsstoffe, vor allem hinsichtlich ihrer apoptosehemmenden und Zellzyklus-beeinflussenden Wirkungen, eine Rolle spielen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Ebenso erlaubt die vorliegende Arbeit keine Rückschlüsse darauf, welche der für die Fermentation verwendeten OS eine besonders positive Wirkung auf Faktoren haben, die die Colonicarcinogenese hemmen können (z.B. Induktion von Apoptose). Für zukünftige Studien sollten FÜ mit größeren Unterschieden in ihrer SCFA-Zusammensetzung verwendet werden. Außerdem sollten dieselben OS, die für die *in vitro*-Fermentationen verwendet werden, in Tierstudien oder in humanen Interventionsstudien hinsichtlich ihrer Fermentierbarkeit untersucht werden.

Summary

Colon cancer is the second most common cancer in Germany. The role of dietary fibre in the prevention of colon cancer is still controversial: Promising results from *in vitro* and animal studies are contradictory to inconsistent results from epidemiological studies. Functional carbohydrates as constituents of prebiotic food can modify the colonic microflora for the benefit of short chain fatty acid (SCFA)-producing microbial strains. The SCFA-concentrations should also be increased in the distal part of the colon where most colon carcinomas are developing. SCFA are considered to be preventive against colon cancer.

For this study, three different new functional oligosaccharides (OS, made of Isomaltulose and resistant starch) were produced from the Südzucker company and fermented *in vitro* with human feces of healthy test subjects. The resulting fermentation supernatants (FS) were tested in a cell culture system, using colon carcinoma cell lines of various degrees of differentiation (HT29, HT29 Clone 19A, T84). Cytotoxicity, proliferation, the induction of apoptosis, influences on the cell cycle and electrophysiological parameters were measured. Spectral photometric and flow cytometric methods were performed, as well as measurements in vertical diffusion chambers (Ussing chambers). The parallel testing of SCFA-mixtures with the same SCFA-concentrations as in the FS was included, as well as the testing of a FS „Control“ which was produced without OS-fermentation.

Several independent fermentations revealed reproducible results regarding the SCFA-concentrations of the FS. After OS-fermentation, the ratio of the three major SCFA in the FS, acetate, propionate, and butyrate, was similar to that observed *in vivo*.

The FS and SCFA-mixtures tested had a cytotoxic effect on all cell lines at the concentration of 50 %. A dose dependent decrease in cell proliferation could be found, as well as the induction of apoptosis at a concentration of 50 %. Parallel testing of the analogous SCFA-mixtures showed that cytotoxic and proliferation inhibiting effects of the FS could be primarily attributed to their SCFA-content. This could not be confirmed for apoptosis induction: the SCFA-mixtures were mostly able to induce a higher apoptosis rate than the FS. Similarly, the effects of FS and SCFA-mixtures on the cell cycle were

different: The SCFA-mixtures showed more potent inhibition of DNA-synthesis than the analogous FS, which generally led to an arrest in the G2-phase of the cell cycle. Neither FS nor SCFA-mixtures had an impact on transepithelial resistance or short circuit current of differentiated cell monolayers in Ussing chambers.

The difference in the fermentation patterns of the various FS and the SCFA-concentrations of the SCFA-mixtures was not great enough to achieve significantly different results in the test systems used. Also, the various differentiation grades of the cell lines showed inconsistent results after treatment with FS and their SCFA-mixtures, so that no correlation could be found between degree of differentiation and test compound action.

This study shows that the *in vitro* fermentation of OS with human feces results in reproducible SCFA-patterns in the FS, similar to the *in vivo* situation. For the screening of FS and their SCFA-mixtures, respectively, a spectrum of methods was established for the incubation with colon carcinoma cell lines of various differentiation states and of all stages of growth (exponential, subconfluent, confluent, fully differentiated monolayer). Indeed, the effects measured after incubation with FS could only in part be ascribed to their SCFA content. Other FS components than SCFA that play a role, especially regarding to their apoptosis inhibiting and cell cycle influencing effects, remain to be identified. Also, this study allows no conclusions to be drawn, which of the fermented OS is more promising in its beneficial influence on colon cancer preventing factors, e.g. the induction of apoptosis, than the other. Future studies should investigate FS with greater differences in their SCFA-concentrations. The same OS which were used for the *in vitro* fermentation, should also be tested in animal studies and human intervention studies to elucidate their fermentation patterns *in vivo*.

2 Einleitung

2.1 Mikrobielle Fermentation im Dickdarm

2.1.1 Mikrobielle Besiedelung des Gastrointestinaltrakts

Bei der Geburt ist der menschliche Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) nahezu keimfrei. Die Kolonisierung beginnt kurz nach der Geburt, zunächst mit gram-positiven Kokken, Enterobakterien und Laktobazillen, dann zunehmend mit obligat anaeroben Stämmen. Bei gestillten Säuglingen überwiegt die Bifidobakterien-Flora. Nach der Stillzeit wird die Bakterienflora vielfältiger und hat nach ca. zwei Lebensjahren die Zusammensetzung der Flora eines Erwachsenen erreicht [Steer *et al.*, 2000].

Der Dickdarm eines Erwachsenen wird von zahlreichen Bakterienspezies besiedelt, von denen bisher mehr als 400 identifiziert wurden. Bis zu 10^{12} Bakterien einer einzelnen Population können in 1 g Darminhalt vorhanden sein [Reuter, 2001]; dazu zählen residente Stämme und ein variables Spektrum transienter Spezies, die vorübergehend Nischen der residenten Flora besetzen [Lu & Walker, 2001]. Jedes Individuum verfügt wahrscheinlich über eine einzigartige individuelle Bakterienflora, die über längere Zeiträume stabil bleibt [Zoetendal *et al.*, 1998]. Die Bakterienzahlen sind am höchsten im Caecum, gefolgt vom Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens [Priebe *et al.*, 2002]. Die Mikroflora wird von obligaten Anaerobiern dominiert, die endogene und exogene Substrate fermentieren. Als Produkte der Fermentation entstehen unter anderem die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) Acetat, Propionat und Butyrat, die als Energiequelle der Darmepithelzellen dienen und von Leber, Muskulatur und Gehirn metabolisiert werden können (s. 2.1.2) [Steer *et al.*, 2000]. Die Stabilität der Mikroflora verhindert effektiv die Besiedelung eingedrungener Mikroorganismen, einschließlich pathogener Keime, was als Kolonisierungs-Resistenz bezeichnet wird. Wird diese Stabilität gestört, können potentiell pathogene Keime, die normalerweise durch die Flora am Wachstum gehemmt werden, die residente Flora überwuchern und zu Krankheiten führen, z.B. führt starkes Wachstum von *Clostridium difficile* nach Antibiotika-Einnahme zu Pseudomembranöser Colitis [Guarner & Malagelada, 2003].

Die Zusammensetzung der Colonflora wird mit der Entstehung zahlreicher Krankheitsbilder in Verbindung gebracht. So wurden bei Neugeborenen, die später eine Atopie entwickelten, im Vergleich zu nicht-atopischen Säuglingen mehr Clostridien und weniger Bifidobakterien nachgewiesen [Kalliomaki *et al.*, 2001]. In einer anderen Studie mit atopischen Kindern wurde eine direkte Korrelation der Serum-IgE-Konzentration mit der Anzahl von *E.coli* im Stuhl beobachtet [Kirjavainen *et al.*, 2002]. Patienten mit M. Crohn weisen eine signifikant höhere Enterobacteriaceae-Zahl auf, ihre Mikroflora ist weniger stabil als die Gesunder [Seksik *et al.*, 2003]. Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa weisen im Vergleich zu Gesunden ein um das Zwei- bis Dreifache reduziertes Keimspektrum, vor allem bei den anaeroben Stämmen, auf [Ott *et al.*, 2004]. In Colon-Biopsien von Patienten mit M. Crohn und Colonkrebs wurde unterhalb der Mucus-schicht und auch intraepithelial ein breites Spektrum aerober Bakterien, insbesondere adhäsive *E.coli*, nachgewiesen. Die Colonmucosa Gesunder ist nach Entfernung der Mucusschicht fast frei von aeroben Bakterien [Martin *et al.*, 2004]. Vermutlich spielen Bakterien der Colon-Mikroflora auch eine Rolle bei der Entstehung von Colonkrebs, indem sie Carcinogene produzieren oder auch anticarcinogene Substanzen sezernieren. So synthetisiert z.B. *Bacteroides spp.* Fecapentaene, die sich *in vitro* und in Tierstudien als potente Mutagene erwiesen. Einige *Enterococcus faecalis*-Stämme produzieren extrazelluläres Superoxid, was zu oxidativem Stress in Colonepithelzellen führt. Heterozyklische Amine können durch Darmbakterien zu genotoxischen Substanzen aktiviert werden [Huycke & Gaskins, 2004]. Andererseits besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem endemischen Auftreten von Infektionen durch enterotoxische *E.coli* mit sekretorischen Durchfällen und einer niedrigen Inzidenz von Colonkrebs. Die Ursache könnte sein, dass hitzestabile Enterotoxine dieser Bakterien die DNA-Synthese von Colon-Carcinomzellen durch Bindung an Guanylylcyclase C hemmen [Pitari *et al.*, 2003].

SCFA sind ebenfalls Stoffwechselprodukte der bakteriellen Mikroflora (s. 2.1.2.2), die als anticarcinogen gelten. Vor allem Butyrat erwies sich in zahlreichen *in vitro*- und Tierstudien als wirksame Substanz, die zahlreiche Faktoren der Carcinogenese positiv beeinflussen kann (s. 2.1.2.4).

2.1.2 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) als Endprodukte bakterieller Fermentationsprozesse

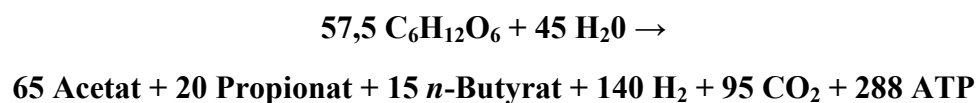
2.1.2.1 Definition SCFA

Kurzkettige Fettsäuren sind Carbonsäuren mit einer Carboxylgruppe als funktionelle Gruppe und einem Acylrest mit 2-4 C-Atomen. Bei der bakteriellen Fermentation im Dickdarm entstehen im Wesentlichen Essigsäure (CH₃COOH), Propionsäure (C₂H₅COOH) und Buttersäure (C₃H₇COOH). Buttersäure hat einen pK-Wert von 4,81, dissoziiert also bei pH 7 vollständig zum Butyrat-Anion. Der pK-Wert für Acetat liegt bei 4,75, für Propionat bei 4,87. Auch diese beiden Fettsäuren liegen bei physiologischem pH fast ausschließlich als Anionen vor.

2.1.2.2 Bildung und Konzentrationen der SCFA

Durch Magen und Dünndarm unverdaute Nahrungsbestandteile gelangen in den Dickdarm und stehen der bakteriellen Metabolisierung zur Verfügung. Dazu zählen unverdaute Reste von Fetten, Proteinen, Mono- und Disacchariden und resistente Stärke. Ballaststoffe (Definition s. 2.3) werden ausschließlich im Dickdarm fermentiert. In den Dickdarm gelangen außerdem Mineralstoffe und Spurenelemente, Vitamine und Nicht-Nahrungsbestandteile wie Verdauungsenzyme, Mucus und abgeschilferte Epithelzellen [Priebe *et al.*, 2002].

Colonbakterien metabolisieren die verfügbaren Kohlenhydrate als Energiequelle für Wachstum und Lebenserhalt. Die folgende Gleichung stellt ein Beispiel eines bakteriellen Fermentationsprozesses dar [Williams *et al.*, 2001]:



Die Gesamt-SCFA-Konzentration (Acetat + Propionat + Butyrat) im Dickdarm variiert je nach Darmabschnitt. Sie ist am höchsten im Caecum (ca. 120 mmol/kg Darminhalt) und nimmt sukzessive bis zum Rectum ab, wo noch ca. 87 mmol/kg gemessen wurden. Im Dünndarm konnten keine relevanten Konzentrationen festgestellt werden, lediglich im Ileum, nahe der Ileo-Caecalklappe, beträgt die SCFA-Konzentration ca. 12 mmol/kg Darminhalt. Das molare Verhältnis der drei Haupt-Fettsäuren Acetat:Propionat:Butyrat ist im linken und rechten Colon mit 57:22:21 bzw. 57:21:22 praktisch gleich. Mit der

SCFA-Konzentration korreliert der pH-Wert in den entsprechenden Darmabschnitten von 5,6 im Caecum bis 6,6 im absteigenden Colon [Cummings *et al.*, 1987].

SCFA, die im Stuhlwasser nachgewiesen werden können, stammen fast vollständig aus bakteriellen Fermentationsprozessen [Ruppin *et al.*, 1980]. Menge und SCFA-Muster sind abhängig vom verfügbaren Substrat. So werden unlösliche Ballaststoffe wie Cellulose und Lignin nur zu 5-20 % anaerob fermentiert und tragen hauptsächlich zur Erhöhung der Stuhlmasse und einer Verminderung der Transitzeit des Darminhalts bei. Im Gegensatz dazu werden lösliche Ballaststoffe wie z.B. Pektin fast vollständig durch die Colon-Mikroflora fermentiert [Wachtershauser & Stein, 2000; Muir *et al.*, 2004]. L-Rhamnose, ein Polysaccharid-Baustein in Pflanzengummis und -schleimen und einigen pflanzlichen Nahrungsmitteln wie z.B. Hülsenfrüchten, wird vorwiegend zu Propionat verstoffwechselt; Lactulose, ein synthetisches Disaccharid aus Galactose und Fructose, überwiegend zu Acetat [Fernandes *et al.*, 2000; Vogt *et al.*, 2004]. Beispiele der Stoffwechselwege bakterieller Fermentationsprozesse sind in Abb. 1 aufgezeichnet. Bei der Gärung werden energiereiche Phosphatbindungen von Zwischenprodukten wie z.B. Acetyl-CoA, Propionyl-CoA oder Butyryl-CoA auf ADP übertragen (Substratkettenphosphorylierung). Je nach Bakterienstamm werden unterschiedliche Stoffwechselwege beschriftet, z.B. gehört *Clostridium butyricum* zu den Butyratbildnern, Propionibakterien bilden Propionat, *Lactobacillus*-Arten Lactat [Madigan *et al.*, 2001]; Acetat wird jedoch im Verhältnis zu Propionat und Butyrat am meisten gebildet (s.o. Fermentationsgleichung). Es kann, ebenso wie Fermentationsprodukte wie z.B. Lactat und Succinat, von Butyrat-produzierenden Bakterienstämmen als Substrat genutzt werden [Duncan *et al.*, 2004].

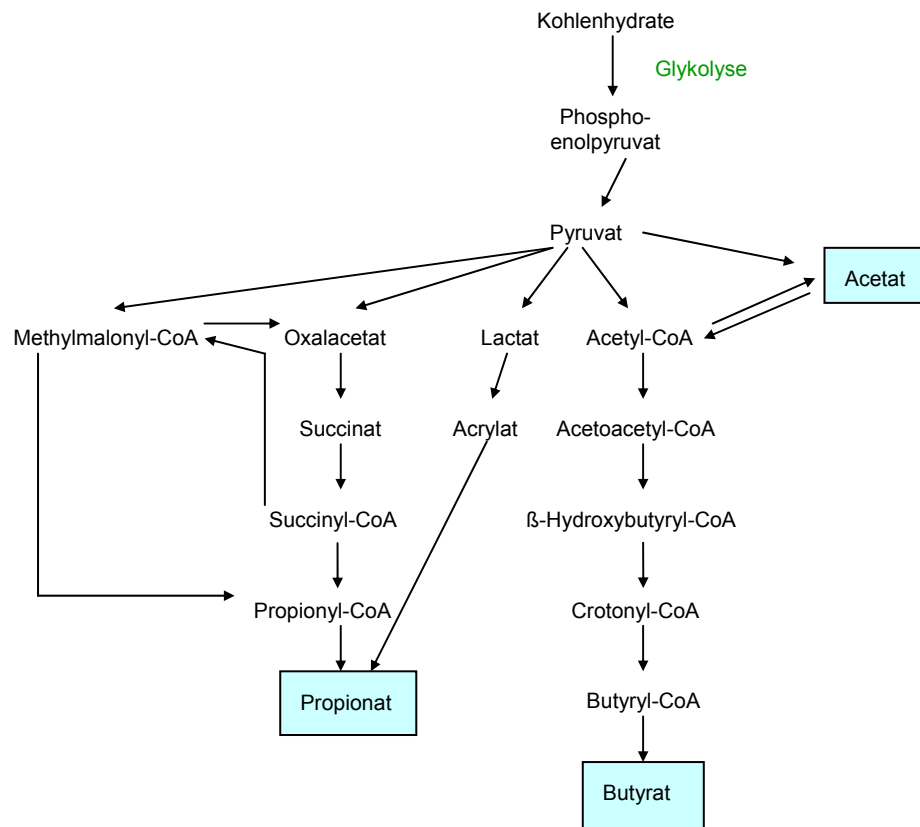


Abb. 1: Stoffwechselwege bakterieller Kohlenhydratvergärung im Colon (Beispiele). Anaerobe Bakterien gewinnen an verschiedenen Stellen der Abbauprozesse Energie durch Substratkettenphosphorylierung. Darstellung modifiziert nach [Madigan *et al.*, 2001; Pryde *et al.*, 2002].

Proteine werden hauptsächlich im distalen Colon fermentiert. Wahrscheinlich greifen die Bakterien der Colon-Mikroflora auf die Proteinfermentation als Energiequelle zurück, wenn Kohlenhydrate wegen der bereits stattgefundenen Fermentation im proximalen Colon nicht mehr in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Neben SCFA entstehen bei der Proteinfermentation noch Gase, Ammoniak, biogene Amine, Sulfide und Phenole [Hughes *et al.*, 2000].

2.1.2.3 Absorption und Stoffwechsel der SCFA

Mehr als 95 % der bakteriell gebildeten SCFA werden vom Colonepithel absorbiert und erscheinen daher nicht im Stuhl. Mittels Colonperfusion bei gesunden Probanden wurde ein konzentrationsabhängiger nicht sättigbarer Transport bis zu einer Konzentration von 90 mM SCFA nachgewiesen [Ruppin *et al.*, 1980]. Protonierte SCFA sind fettlöslich und diffundieren durch die Zellmembran. Bei im Colon vorherrschenden pH-Werten

liegen SCFA allerdings zu ca. 95 % in ionisierter Form, also nicht fettlöslich, vor und müssen über spezifische Transportmechanismen in die Colonepithelzellen aufgenommen werden [Wachtershauser & Stein, 2000].

Butyrat wird über den Monocarboxylat-Transporter **MCT1** transportiert. MCT1 ist einer von mindestens neun bisher entdeckten Monocarboxylat/H⁺-Cotransportern (MCT) mit 10–12 Transmembrandomänen, die in vielen Geweben und Organen exprimiert werden und metabolisch wichtige Monocarboxylat-Verbindungen wie Pyruvat, Lactat oder Ketonkörper transportieren [Halestrap & Price, 1999]. MCT1 ist in der luminalen Membran von Colonepithelzellen lokalisiert. In den kultivierten Colonepithelzellen AA/C1 wurde die Expression von MCT1 und damit die Butyrat-Aufnahme in die Zellen konzentrationsabhängig durch Butyrat gesteigert; Acetat und Propionat zeigten keinen Einfluss auf die Expression [Cuff *et al.*, 2002]. Die MCT1-Expression in Colonadenom- und Carcinomzellen ist stark reduziert, am stärksten, je undifferenzierter die Krebszellen sind. Die MCT1-Suppression wird begleitet von der Expression des Glucosetransporters GLUT1 mit hoher Affinität zu Glucose und einer Herunterregulation von GLUT2, der eine niedrige Glucoseaffinität besitzt. Colonicarcinomzellen zeigen, wie viele andere maligne Zellen auch, einen erhöhten Glucoseverbrauch [Lambert *et al.*, 2002].

SCFA werden ebenfalls über den Na⁺-gekoppelten Transporter **SLC5A8** (oder SMCT = sodium-coupled monocarboxylate transporter) in die Colonepithelzellen transportiert. Von den 220 Mitgliedern der SLC5-Familie von Cotransportern, zu der unter anderem auch der Na⁺/Glucose-Cotransporter SGLT1 gehört, werden elf beim Menschen exprimiert. *SLC5A8* ist ein Tumor-Suppressorgen, das bei Dickdarmkrebs durch Methylierung deaktiviert wird. Das Protein, das durch *SLC5A8* kodiert wird, transportiert SCFA mit einer Kettenlänge von 2-5 C-Atomen und Na⁺-Ionen im Verhältnis 1:4. Diese erst kürzlich entdeckte Funktion von *SLC5A8* könnte darauf hinweisen, dass die Absorption von SCFA in Colonkrebszellen vermindert ist, was die Entstehung von Krebs begünstigen könnte [Miyachi *et al.*, 2004; Wright & Turk, 2004].

SCFA, die in die Colonozyten aufgenommen wurden, werden entweder als Energiequelle genutzt (70-90 % des im Colon gebildeten Butyrats) oder sie treten in das Pfortaderblut über. In den Colonepithelzellen wird Butyrat durch β -Oxidation im Linnen-

Zyklus verstoffwechselt. Hierbei wird Butyrat auf dem umgekehrten Weg wie bei der Butyrat-Synthese in Abb. 1 in Acetoacetyl-CoA bzw. Acetyl-CoA überführt. Daraus werden über die Zwischenstufe 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat gebildet [Wachtershauser & Stein, 2000].

Im Pfortaderblut wurden Gesamt-SCFA-Konzentrationen (Acetat + Propionat + Butyrat) von 375 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Das molare Verhältnis dieser drei Fettsäuren lag bei 71:21:8, im Vergleich zum Colon eine Zunahme im Verhältnis von Acetat und eine deutliche Abnahme von Butyrat. In der Lebervene betrug das molare Verhältnis 81:12:7, was auf eine Verstoffwechslung von Propionat in der Leber hinweist. Im peripheren Blut ist Acetat mit 91:5:4 die dominante Fettsäure [Cummings *et al.*, 1987] und kann bis zu ca. 7 % als Energiequelle im Ruheumsatz beitragen [Pouteau *et al.*, 1996].

2.1.2.4 Rolle der SCFA bei Dickdarmkrebs

SCFA spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Proliferation des Colonepithels: Hohe SCFA-Spiegel sind bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) mit vorangegangener Polypektomie mit einer niedrigeren Proliferationsrate verbunden [Dolara *et al.*, 2002]. Ebenso sind sie mit einer Absenkung des pH-Wertes im Darmlumen assoziiert. Bei Patienten mit Krebs im sigmoidalen Colon wurde im Vergleich mit Gesunden ein signifikant höherer pH-Wert im Stuhl gemessen [Kanazawa *et al.*, 1996]. Acetat, Propionat und Butyrat hemmten in einem *in vitro*-Modell in 0,01 M Konzentration die Invasivität primärer Colon-Carcinomzellen, die zuvor aus chirurgischem Material von Patienten mit invasiven Colonicarcinomen isoliert wurden. Butyrat zeigte dabei die stärkste Wirkung, gefolgt von Propionat und Acetat [Emenaker *et al.*, 2001].

Butyrat ist die bisher am besten untersuchte kurzkettige Fettsäure und wird allgemein als Markersubstanz für die Fermentation von Ballaststoffen und chemoprotektive Effekte auf die Colonicarcinogenese betrachtet. Butyrat ist zum einen eine wichtige Energiequelle für Colon-Epithelzellen (s. 2.1.2.3) und stimuliert deren Proliferation, zum anderen hemmt es das Wachstum von Colon-Carcinomzellen und induziert Differenzierung und Apoptose (Butyrat-Paradox). So führt die Inkubation der undifferenzierten Colonicarcinom-Zelllinie HT29 mit Na-Butyrat zu einem permanent differenzierten Clon, den HT29 Clon 19A-Zellen, die auch für diese Arbeit verwendet wurden [Augeron & La-

boisse, 1984]. Die Ursachen für die widersprüchlichen Effekte von Butyrat *in vivo* und *in vitro* sind noch nicht geklärt. In *in vitro*-Zellkulturmodellen wurde gezeigt, dass Glucosedepletion des Kulturmediums das Zellwachstum hemmt und Apoptose induziert. Niedrige Konzentrationen an Butyrat als Ersatz für Glucose im Medium kehrten diesen Effekt um, in höheren Konzentrationen fungierte Butyrat weiterhin als Wachstumshemmer und Apoptoseinduktor. Die Wirkung von Butyrat könnte also von der Verfügbarkeit anderer Energiequellen für die Zellen abhängen [Singh *et al.*, 1997].

Die Präinkubation isolierter Zellen aus dem distalen Rattencolon mit Butyrat und Acetat hatte einen signifikant protektiven Effekt gegen oxidative Schädigung der Zellen durch H_2O_2 . Propionat sowie Gemische aus Acetat, Propionat und Butyrat zeigten keine protektiven Effekte. Allerdings waren die SCFA-Konzentrationen in den Gemischen relativ niedrig gewählt [Abrahamse *et al.*, 1999]. Butyrat hemmte die Proliferation von Colonicarcinom-Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad (HT29, HT29 Clon 19A und T84) und induzierte Apoptose. Auch Acetat und Propionat wirkten proliferationshemmend und Apoptose induzierend, jedoch mit geringerer Effektivität [Roser *et al.*, 2003]. Butyrat wirkte bei HT29-Zellen über einen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase und stimulierte die $p21^{WAF1/CIP1}$ -Proteinexpression unabhängig vom $p53$ -Status der Zellen [Siavoshian *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2003]. Butyrat ist ein Inhibitor der Histon-Deacetylase und führt dadurch zur Histon-Hyperacetylierung. Dadurch ändert sich die Chromatinstruktur und die DNA wird leichter zugänglich für verschiedene Transkriptionsfaktoren.

2.2 Darmkrebs

2.2.1 Epidemiologische Daten

Darmkrebs (Krebserkrankungen des Dickdarms, Mastdarms und des Anus) ist in Deutschland bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird für Männer auf über 32.000, für Frauen auf über 34.000 geschätzt. Damit ist die Inzidenz in Deutschland innerhalb der EU-Länder am höchsten. Für die nächsten Jahrzehnte wird ein Trend in der Zunahme der Erkrankungs-raten angenommen. Nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen ist

Darmkrebs die häufigste Krebs-Todesursache in Deutschland [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004].

Darmkrebs entsteht durch die schrittweise Akkumulierung von Mutationen in verschiedenen Schlüsselgenen, die einer bestimmten Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen verschaffen. Diese Anhäufung braucht meistens Jahrzehnte, bevor es, durchschnittlich im 7. Lebensjahrzehnt, zur Ausbildung eines invasiven Tumors kommt [Gryfe *et al.*, 1997].

2.2.2 Beteiligte Gene

An der Krebsentstehung sind drei verschiedene Genklassen beteiligt:

- Proto-Oncogene: kodieren Proteine, die Zellwachstum und -differenzierung steuern; können nach Mutationen zu Onkogenen werden und das Zellwachstum verstärkt fördern. Ein Beispiel sind Mutationen von *k-ras*, die in ca. 40 % aller Colon-Carcinome nachgewiesen wurden [Grady & Markowitz, 2002].
- Tumor-Suppressorgene: Zu den Tumor-Suppressorgen gehört z.B. *p53*, das bei über 50 % aller Colon-Adenocarcinome mutiert ist. Wahrscheinlich sind *p53*-Mutationen ein relativ spätes Ereignis in der Adenom-Carcinom-Sequenz (s. Abb. 2), da sie bisher nur in Carcinomen, nicht aber in Adenomen, gefunden wurden. *P53* wird verstärkt nach DNA-Schädigungen, z.B. durch γ -Strahlen oder UV-Strahlung, exprimiert. Das *P53*-Protein aktiviert die Transkription nachgeordneter Gene, die Zellzyklus (s. 2.2.7) und Apoptose (s. 2.2.6) regulieren, z.B. *p21^{WAF1/CIP1}*, *bax*, *fas* oder *cyclin G*. Daraufhin werden DNA-Reparatur, Zellzyklus-Arrest oder Apoptose induziert. Wegen seiner Fähigkeit, DNA-Schäden zu erkennen und Gegenmaßnahmen einzuleiten, wird *p53* auch als „guardian of the genome“ bezeichnet [Gryfe *et al.*, 1997; Grady & Markowitz, 2002]. Auch *APC* (s. 2.2.4.2) gehört zu den Tumor-Suppressorgen.
- DNA-Reparaturgene: können nach Mutationen die exakte DNA-Replikation nicht mehr gewährleisten und führen so zu Mutationen bei Proto-Oncogenen und Tumor-Suppressorgen [Gryfe *et al.*, 1997].

2.2.3 Einflussfaktoren

Risikofaktoren für die Entstehung von Coloncancer sind hohe Energieaufnahme, niedrige körperliche Aktivität und Adipositas [Giovannucci *et al.*, 1995].

Epidemiologische Studien deuten außerdem auf einen Zusammenhang zwischen Ernährung und Dickdarmkrebs hin. Es gibt Hinweise darauf, dass rotes und verarbeitetes Fleisch (z.B. Rind, Lamm) das Colonkrebs-Risiko erhöhen, während weißes Fleisch (z.B. Geflügel) entweder keinen Einfluss auf das Krebsrisiko oder sogar einen Risiko senkenden Effekt hat [Bingham, 1999]. Ein hoher Obst- und Gemüseverzehr ist mit einer signifikanten Verminderung des Colonkrebs-Risikos assoziiert [Riboli & Norat, 2003]. Bei zwei großen prospektiven Kohortenstudien, der Nurses' Health Study und der Health Professionals Follow-Up Study, wurde eine inverse Korrelation zwischen höherer Calciumaufnahme (bis 700 mg/Tag) und Colonkrebs-Risiko festgestellt [Wu *et al.*, 2002].

Die Rolle der Ballaststoffe bei der Coloncancerogenese ist umstritten (s. 2.3), ebenso unklar ist bisher der Einfluss von Gallensäuren. Sekundäre Gallensäuren, vor allem Deoxycholsäure (DA), gelten als Tumorpromotoren. In der Coloncancerzelllinie HCT116 hemmte DA die P53-Expression und damit die Möglichkeiten der Zellen, DNA-Schäden zu reparieren [Qiao *et al.*, 2001]. Bei SW480- und LoVo-Coloncancer-Zellen aktivierte DA in physiologischen Konzentrationen den β -Catenin-Signalweg (s. 2.2.4.2); es kam zur Akkumulation von β -Catenin im Cytoplasma, damit zu gesteigertem Zellwachstum und erhöhter Invasivität [Pai *et al.*, 2004]. Die Ergebnisse aus Humanstudien sind jedoch inkonsistent. So konnte im Vergleich einer Patientengruppe mit Krebs des sigmoiden Colon mit einer gesunden Kontrollgruppe kein Unterschied in den Konzentrationen freier, konjugierter oder sulfatierter Gallensäuren im Stuhl festgestellt werden [Kanazawa *et al.*, 1996]. In einer anderen Studie wurde bei Patienten mit Colonadenomen und -cancer in Darmflüssigkeit des Colon ascendens und des Caecum ein höherer Anteil von sekundären Gallensäuren an den Gesamt-Gallensäuren im Vergleich zu Gesunden festgestellt [Kishida *et al.*, 1997]. Patienten, die sich einer Cholecystectomy unterziehen mussten, haben ein erhöhtes Risiko, an Adenocarcinomen des proximalen Colons zu erkranken. Eine mögliche Ursache könnte der unabhängig von den Mahlzeiten kontinuierliche Gallenfluss und die dabei ausbleibende Verdünnung durch Nahrung und Magensaft sein [Lagergren *et al.*, 2001].

2.2.4 Entstehung

2.2.4.1 Adenom-Carcinom-Sequenz

Die Adenom-Carcinom-Sequenz (s. Abb. 2) beschreibt die schrittweise Entstehung von Carcinomen von präneoplastischen Läsionen über die Bildung von Adenomen verschiedener Stadien, die sich zu Adenocarcinomen entwickeln können. Der Übergang von noch gutartigen Vorläuferstadien zur malignen Entartung ist mit der Akkumulation genetischer Defekte assoziiert [Fearon & Vogelstein, 1990].

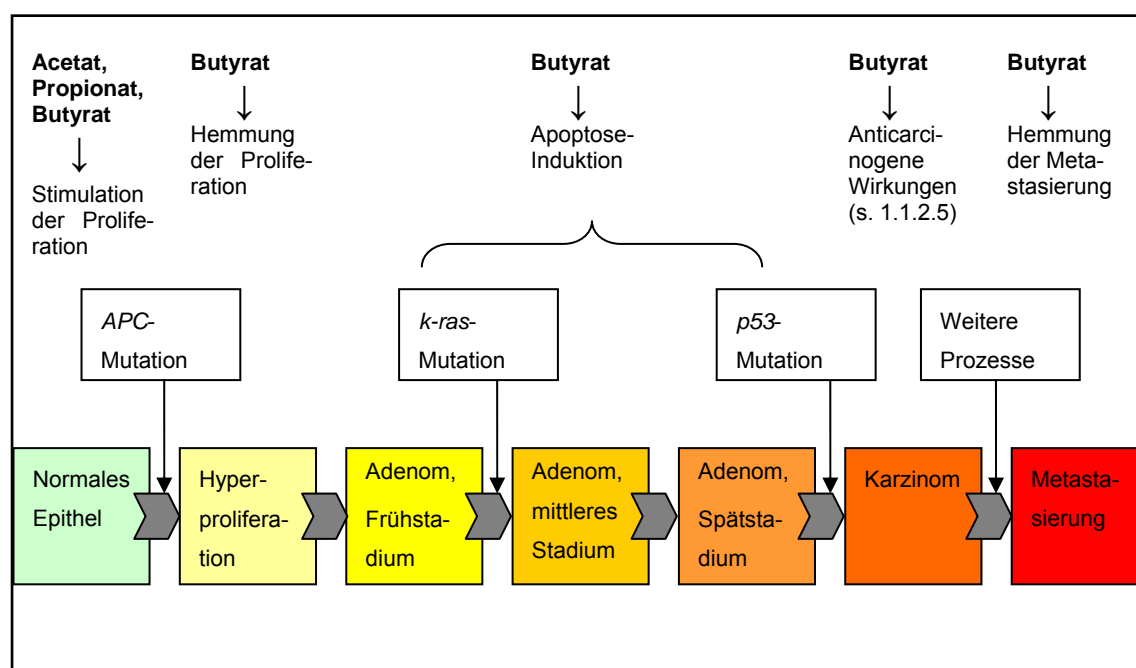


Abb. 2: Adenom-Carcinom-Sequenz: Die meisten colorectalen Carcinome entstehen aus Adenomen, die allmählich größer und dysplastischer werden. Die Carcinogenese erfolgt über eine Reihe genetischer Veränderungen, von denen die häufigsten dargestellt wurden: Eine *APC*-Mutation tritt bei fast allen colorectalen Tumoren auf, eine *k-ras*-Mutation bei 30-40 %, eine *p53*-Mutation bei ca. 50 %. SCFA können in allen Stufen des Modells in die Colonicarcinogenese eingreifen. Modifiziert nach [Fearon & Vogelstein, 1990; Wächtershäuser & Stein, 2000].

2.2.4.2 APC-Gen, Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)

Die meisten Colonicarcinome entstehen sporadisch, nur schätzungsweise 10 % der Erkrankungen gehen auf genetische Prädispositionen zurück, wie das Hereditäre Colorectale Carcinom ohne Polyposis, die Familiäre Adenomatöse Polyposis und Hamartomöse Polyposis-Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom [Lamberti *et al.*, 1996].

FAP ist eine seltene, autosomal dominant vererbte Krankheit, die durch Keimbahnmutationen des *APC*-Gens verursacht wird. Im Laufe des 20. bis 30. Lebensjahrs entwi-

ckeln sich hunderte bis tausende colorectale Adenome, die sich unbehandelt zu Adenocarcinomen entwickeln können [Gryfe *et al.*, 1997]. Auch die meisten sporadischen Colontumore beruhen auf *APC*-Mutationen. Diese Mutationen sind die frühesten bekannten genetischen Veränderungen der Colon-Carcinogenese, die bereits in den kleinsten Adenomen und in aberranten Krypten nachgewiesen werden können [Heppner Goss & Groden, 2000]. Das Genprodukt des Tumor-Suppressorgens *APC*, APC, ist ein wichtiger Regulator des intrazellulären β -Catenin-Spiegels. Fehlt APC oder liegt in funktionsunfähiger Form vor, akkumuliert β -Catenin in der Zelle und der Wnt-Signalweg (Wnt = wingless-type) wird verstärkt aktiviert. Freies β -Catenin translociert zum Nucleus und dient dort als Cofaktor für Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren (Tcf = T-cell factor, Lef = lymphoid enhancing factor). Zielgene sind z.B. *c-myc*, ein Proto-Oncogen, das bei colorectalen Tumoren überexprimiert wird, und *cyclin D1* [Kolligs *et al.*, 2002].

2.2.5 Apoptose

Apoptose ist ein genetisch kontrollierter und von den Zellen selbst gesteuerter Prozess des Zelltods („programmierter Zelltod“), der als normaler physiologischer Prozess hilft, das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellwachstum aufrecht zu erhalten. Überwiegt die Apoptose im Vergleich zur Proliferation, kommt es zu Gewebeverlust (Dystrophie, Atrophie), überwiegt die Proliferation, kommt es zur Neubildung von Gewebe (Neoplasie). Von der Apoptose abzugrenzen ist die Nekrose, die einen passiven Prozess darstellt und als Reaktion einer Zelle auf schwere plötzliche Zellschädigungen wie z.B. Ischämie, Hyperthermie oder chemische Noxen eintritt [Kerr *et al.*, 1972].

Die Apoptose läuft nach einem charakteristischen Muster ab, was zu bestimmten morphologischen Veränderungen, wie z.B. der Kondensation des Cytoplasmas, der Fragmentierung des Zellkerns, Membranveränderungen und der Bildung membranumschlossener Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“), führt. Die DNA im Zellkern wird zu Nukleosomen und Oligonukleosomen aus 180 Basenpaaren bzw. einem Vielfachen davon abgebaut. Die Apoptose muss aber nicht notwendigerweise mit einer DNA-Schädigung der Zellen einhergehen. In einer Studie mit HT29-Coloncarcinom-Zellen konnte gezeigt werden, dass bekannte DNA-schädigende Agenzien wie z.B. MNNG (*N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin) keine Apoptose induzieren konnten, während in der Mikrogel-Elektrophorese signifikante DNA-Schädigungen auftraten. Der Apopto-

seinduktor Staurosporin führte zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate, nicht aber zu DNA-Strangbrüchen [Roser *et al.*, 2001]. Phosphatidylserinreste (PSer-Reste), die normalerweise nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind, werden auf die Außenseite verlagert. Durch diesen Verlust der Membranasymmetrie können apoptotische Zellen von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. Die Zellmembran bleibt aber bei apoptotischen Zellen – im Gegensatz zu nekrotischen – intakt, ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der beiden Formen des Zelltods [Fadok *et al.*, 1992].

2.2.6 Caspasen

Eine Schlüsselfunktion im apoptotischen Prozess nimmt die Caspase-Proteinfamilie ein. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Proteine jeweils nach Aspartat-Resten schneiden können. Caspase-3 wird als eines der wichtigsten apoptotischen Effektorproteine betrachtet. Sie wird durch übergeordnete Initiator-Caspasen wie Caspase-8 und Caspase-9 gespalten und dadurch aktiviert. Aktivierte Caspase-3 ist ein Heterodimer aus 17- und 12 kDa-Untereinheiten, die aus dem 32 kDa-Proenzym hervorgegangen sind. In HT29-Zellen, die mit 3 mM Na-Butyrat inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Caspase-Kaskade über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in Gang gesetzt wird. Die Aktivierung von Caspasen wurde begleitet von der Expression verschiedener Differenzierungsmarker wie z.B. der Alkalischen Phosphatase (AP) [Cai *et al.*, 2004].

2.2.6.1 Apoptose im Gastrointestinaltrakt

Das Epithel des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) ist ein Gewebe mit hohem Zellsatz (schnelle Proliferation und Abstoßung der Zellen). Alle drei bis fünf Tage erneuert sich das gesamte Darmepithel. Pro Stunde werden beim Menschen ca. 200 Zellen/mm² in das Darmlumen abgestoßen; die Integrität der Darmmucosa bleibt dabei durch neue Zellen gewährleistet, die aus der Proliferationszone der Krypten nachwandern (s. Abb. 3) [Johnson, 2002].

An der Kryptenbasis wird die Stammzellregion vermutet. Die Stammzellen teilen sich wahrscheinlich asymmetrisch, d.h., aus jeder Stammzelle gehen eine neue Stammzelle hervor und eine Tochterzelle, die sich weiter symmetrisch teilt und währenddessen zum oberen Kryptenteil wandert. Im Gegensatz zu den Dünndarmkrypten gibt es in den

Dickdarmkrypten wenig spontane Apoptose und sie scheint auch nicht, wie im Dünndarm, auf die Stammzellregion begrenzt zu sein, sondern verteilt sich auf die gesamte Proliferationszone der Krypte. Ein Grund dafür kann die Expression des antiapoptotischen Gens *bcl-2* sein, das an der Kryptenbasis exprimiert wird. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl an Stammzellen im Colon keiner so strengen Regulation unterliegt wie im Dünndarm und es dadurch zu hyperplastischen Krypten und letztlich auch zu Colonkrebs kommen kann, der sehr viel häufiger auftritt als Dünndarmkrebs [Potten, 1997; Johnson, 2002].

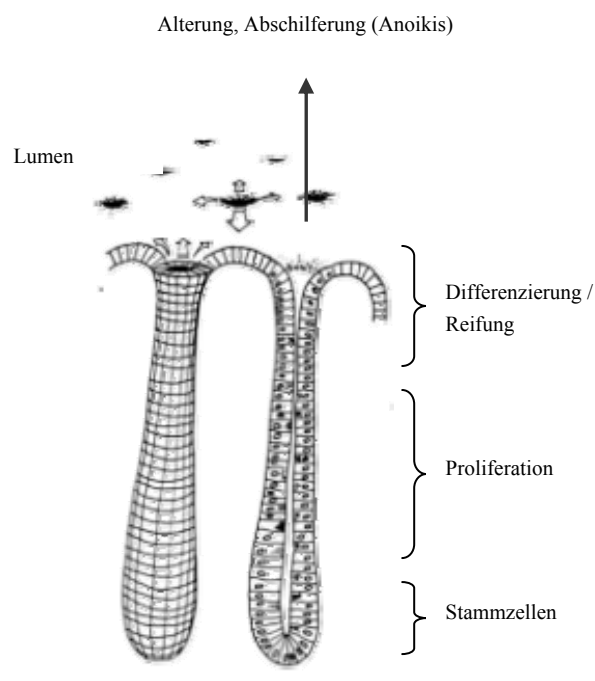


Abb. 3: Morphologie und Zellhierarchie einer Colonkrypte. Stammzellen sind nahe der Kryptenbasis lokalisiert. Während der Wanderung zur Mucosa-Oberfläche differenzieren die Tochterzellen. Gealterte Zellen werden in das Cololumen über eine spezielle Form der Apoptose, Anoikis, abgestoßen. Modifiziert nach [Johnson, 2002].

2.2.7 Zellzyklus

Der Zellzyklus gliedert sich in die G₁-, S-, G₂- und M-Phase (s. Abb. 4). In der G₁-Phase tritt die Zelle in den Zellzyklus ein und bereitet die DNA-Synthese vor, die während der S-Phase abläuft. Während der G₂-Phase hat die Zelle die Möglichkeit, Fehler, die bei der DNA-Duplikation entstanden sind, zu reparieren, so dass eine Weitergabe fehlerhafter DNA an die Tochterzellen vermieden wird. Die M-Phase schließlich ist die Mitosephase, in der sich die Chromatiden und schließlich die Tochterzellen trennen. Nach der M-Phase kann die Zelle wieder in die G₁-Phase eintreten oder aber in die Ruhephase G₀.

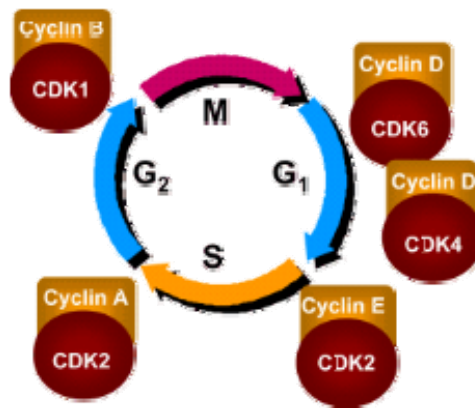


Abb. 4: Zellzyklusphasen mit den wichtigsten in der jeweiligen Phase synthetisierten Zellzyklusproteinen (CDK = Cyclin Dependent Kinase). CDK4-CyclinD und CDK6-CyclinD steuern die Progression durch die G₁-Phase. Der CDK2-CyclinE-Komplex ist verantwortlich für den Übergang der Zelle von der G₁- in die S-Phase. Der CDK2-CyclinA-Komplex steuert die Progression durch die S-Phase, der CDK1-CyclinB-Komplex ist verantwortlich für die Mitosephase [Senderowicz & Sausville, 2000].

CDKs (Cyclin Dependent Kinases) sind die wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus; es existieren mindestens neun (CDK1-CDK9). Sie bestehen aus katalytischen Untereinheiten, die Komplexe mit den Cyclin-Proteinen bilden, von denen mindestens 15 existieren (Cyclin A-Cyclin T). Cycline werden während des Zellzyklus periodisch exprimiert und bezeichnen den Beginn der jeweiligen Zellzyklusphase [Senderowicz & Sausville, 2000].

2.3 Ballaststoffe

Der Begriff „Ballaststoffe“ umfasst ein breites Spektrum verschiedener Substanzen. Bis heute gibt es keine allgemein gültige Definition dieser Substanzgruppe. Ursprünglich wurden Ballaststoffe von Burkitt und Trowell definiert als Rückstände von Pflanzenzellwänden, die im Dünndarm nicht abgebaut werden können und unverdaut den Dickdarm erreichen. Dazu gehörten hauptsächlich Cellulose, Hemicellulose, Lignin und quantitativ weniger bedeutende Substanzen wie Wachse, Cutin und Suberin. Die Ballaststoff-Hypothese nach Burkitt und Trowell stellte eine inverse Beziehung her zwischen Krankheiten, die in wohlhabenden Industrieländern häufig vorkommen („western diseases“), wie Diabetes, Dickdarmkrebs, Diverticulose, Adipositas und Gallenblasenerkrankungen, und der Zufuhr an Ballaststoffen. Der präventive Effekt bei Darmerkrankungen und Dickdarmkrebs wurde unter anderem zurückgeführt auf die Beschleunigung der Darmpassage, eine erhöhte Wasserbindungskapazität und eine Erhöhung des Stuhlvolumens, wodurch zum einen toxische bzw. potentiell carcinogene Substanzen im Darmlumen kürzer mit dem Darmepithel in Kontakt kommen, zum anderen ein Verdünnungseffekt dieser Substanzen eintritt [Burkitt & Trowell, 1975]. Der Ballaststoff-Begriff wurde später ausgeweitet auf alle unverdaulichen Pflanzen-Polysaccharide, z.B. Pflanzengummis, modifizierte Cellulose, Schleime, Oligosaccharide und Pektine. Die American Association of Cereal Chemists (AACC) hat im Jahr 2000 auf physiologischer und chemisch-analytischer Basis eine neue Definition erstellt: „Ballaststoffe sind essbare Pflanzenbestandteile oder analoge Kohlenhydrate (KH)¹, die im Dünndarm nicht verdaut und absorbiert werden können, im Dickdarm jedoch vollständig oder teilweise fermentiert werden. Zu den Ballaststoffen zählen Polysaccharide (PS), Oligosaccharide (OS), Lignin und damit assoziierte pflanzliche Substanzen. Ballaststoffe unterstützen gesundheitsfördernde physiologische Effekte wie die Förderung der Darmentleerung und/oder die Normalisierung des Cholesterinspiegels und/oder die Normalisierung des Blutglucosespiegels“ [Dietary Fiber Definition Committee, 2001; DeVries, 2003]. Die nach der neuesten Definition zu den Ballaststoffen zählenden Substanzen sind, nach Gruppen unterteilt, in Tab. 1 dargestellt.

¹ Analog zu natürlich vorkommenden KH, entstanden durch chemische oder physikalische Einwirkung (z.B. Hitze beim Kochen).

Tab. 1 Substanzen, die nach neuester Definition [Dietary Fiber Definition Committee, 2001] zu den Ballaststoffen gezählt werden. Mitglieder der Lignin-Gruppe sind selbst keine Polysaccharide, kommen aber in Pflanzen vergesellschaftet mit Polysacchariden vor und erhöhen oft zusätzlich deren Unverdaulichkeit im Dünndarm [DeVries, 2003].

Gruppe	Substanz
Nicht-Stärkepolysaccharide (NSP)	Cellulose
	Hemicellulosen
	Arabinoxylane
	Arabinogalactane
	Polyfructosen
	Inulin
	Oligofructane
	Galacto-Oligosaccharide
	Gummis
	Schleime
	Pectine
Analoge Kohlenhydrate	Unverdauliche Dextrine
	Resistente Maltodextrine (z.B. aus Mais)
	Resistente Kartoffeldextrine
	Synthetisch hergestellte Kohlenhydrate
	Polydextrose
	Methylcellulose
	Hydroxypropylmethylcellulose
Resistente Stärke	
Lignin-Gruppe (in Pflanzen assoziiert mit NSP)	Wachse
	Phytate
	Cutin
	Saponine
	Suberin
	Tannine

Ballaststoffe werden weiterhin unterteilt in lösliche und unlösliche Substanzen. Lösliche Ballaststoffe (z.B. Oligofructosen) lösen sich in einer 4:1-Mischung aus Alkohol und Wasser bzw. werden indirekt bestimmt als Differenz zwischen Gesamt-Ballaststoffen und unlöslichen Ballaststoffen [Dietary Fiber Definition Committee, 2001].

Ob Ballaststoffe einen positiven Effekt bei der Colonicarcinogenese haben, ist umstritten. In der Nurses' Health Study konnte kein Zusammenhang zwischen Ballaststoffauf-

nahme und Entwicklung von Adenomen und Carcinomen nachgewiesen werden. Ballaststoffe hatten allerdings einen positiven Einfluss auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diverticulitis [Fuchs *et al.*, 1999]. Beim Polyp Prevention Trial konnte durch eine fettarme Ernährung mit hohem Ballaststoffanteil kein Erfolg bei der Prävention des Wiederauftretens von Colonadenomen erzielt werden [Schatzkin *et al.*, 2000]. Ebenso hatte die Einnahme eines Supplements mit Ballaststoffen aus Weizenkleie in zwei verschiedenen Studien keinen Effekt [Alberts *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 2002]. In der EPIC-Studie, einer großen prospektiven europäischen Studie mit über 500.000 Teilnehmerinnen und Teilnehmern, konnte ein protektiver Effekt von Ballaststoffen bei Colonkrebs nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Studienergebnisse könnten dadurch bedingt sein, dass bei der EPIC-Studie die Spannbreite in der Ballaststoffaufnahme größer war als bei der Nurses' Health Study. In der EPIC-Studie nahmen ca. 30 % der Kohorte täglich wesentlich mehr Ballaststoffe auf als die Teilnehmerinnen der Nurses' Health Study [Bingham *et al.*, 2003]. Zudem fanden in einigen Studien lösliche Ballaststoffe und resistente Stärken kaum Berücksichtigung. Gerade diese Ballaststoffgruppen könnten aber durch ihre gute Fermentierbarkeit und die daraus folgende erhöhte SCFA-Konzentration im Darmlumen einen präventiven Effekt ausüben.

2.3.1 Funktionelle Kohlenhydrate

Der Begriff "**Funktionelle Lebensmittel**" ist in Deutschland bzw. der EU bisher nicht gesetzlich geregelt. Allgemein versteht man darunter natürliche oder verarbeitete Lebensmittel, die über ihre Ernährungsfunktion hinaus einen gesundheitlichen Zusatznutzen haben. Dieser Zusatznutzen kann auch durch Modifizierung des ursprünglichen Produkts erreicht werden, z.B. durch Zusatz potentiell gesundheitsfördernder oder Entfernen möglicher gesundheitsschädigender Substanzen.

Zu den funktionellen Lebensmitteln zählen auch Probiotika und Präbiotika, zu letzteren gehören die funktionellen Kohlenhydrate. Beide Gruppen sollen über eine Modifizierung der Darmflora positive Auswirkungen auf die Gesundheit erzielen. **Probiotika** sind definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und dort positive gesundheitliche Wirkungen erzielen. Auf dem europäischen Markt werden hauptsächlich Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*

(z.B. *L. acidophilus*, *L. casei*) und *Bifidobacterium* (z.B. *B. longum*, *B. breve*) eingesetzt [Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am BgVV, 2000].

Präbiotika sind definiert als unverdauliche Lebensmittelbestandteile, die durch selektive Wachstums- bzw. Aktivitätsstimulierung eines Bakterienstammes oder einer begrenzten Anzahl an Bakterienstämmen gesundheitsfördernde Wirkungen ausüben können. Präbiotika modifizieren die Zusammensetzung der gastrointestinalen Flora, indem sie einigen für den Wirt potentiell gesundheitsfördernden Bakterienstämmen (v.a. Lactobazillen und Bifidobakterien) einen Wachstumsvorteil verschaffen, so dass diese zu den zahlenmäßig vorherrschenden Stämmen gehören [Roberfroid, 1998].

Ein **Synbiotikum** vereint präbiotische und probiotische Eigenschaften in einem Produkt. Vermutlich können Präbiotika das Überleben der probiotischen Bakterien während der Magen-Darm-Passage unterstützen und dadurch deren Ansiedlung im Dickdarm erleichtern [Topping *et al.*, 2003].

Bei zwei der in dieser Arbeit untersuchten Kohlenhydrate handelt es sich um Isomaltulose-Derivate. Isomaltulose (6-*O*- α -D-Glucopyranosyl-D-fructofuranose, Palatinose[®]) ist ein Disaccharid, das natürlich in Honig und Zuckerrohrsaft vorkommt. Industriell wird Isomaltulose aus Saccharose durch enzymatische Umlagerung der glykosidischen Bindung des 1,2-Fructosids in ein 1,6-Fructosid hergestellt (s. Abb. 5).

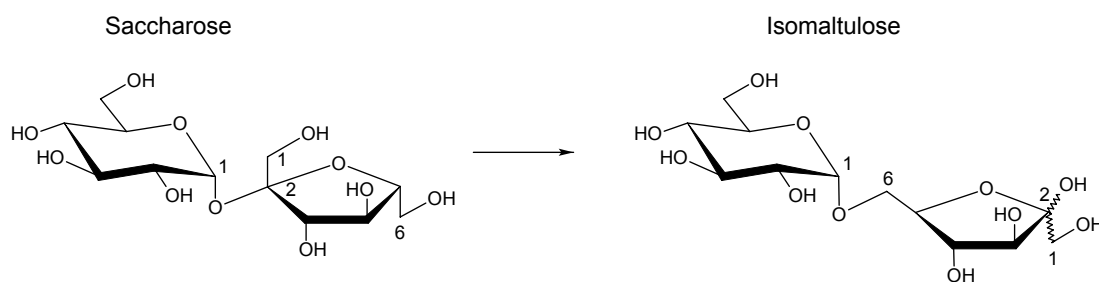


Abb. 5: Enzymatische Umwandlung von Saccharose in Isomaltulose.

Die Süßkraft von Isomaltulose ist etwa halb so groß wie die von Saccharose, Geschmack und Aussehen sind ähnlich. Physikalische und chemische Eigenschaften von Isomaltulose ähneln Saccharose, so dass es in den meisten süßen Lebensmitteln Zucker ersetzen könnte, zumal Isomaltulose bedeutend weniger kariogen ist. Isomaltulose wird zwar vollständig, aber im Vergleich zu Saccharose bedeutend langsamer im Dünndarm gespalten, daher sind Blutzuckeranstieg und Insulinausschüttung verzögert. Toxizitätsstudien zeigten keine negativen Effekte, die Verträglichkeit im Magen-Darm-Trakt war auch in hohen Dosen bis zu 50 g/Tag sehr gut [Lina *et al.*, 2002]. Auf Basis dieses seit Jahren bewährten und in zahlreichen Produkten verwendeten alternativen Süßungsmittels wurden zwei der in dieser Arbeit verwendeten Oligosaccharide hergestellt. Der Unterschied zu Isomaltulose sollte darin bestehen, dass die veränderten Produkte Ballaststoffcharakter haben, also erst im Dickdarm durch intestinale Bakterien abgebaut werden. Die Fermentierungsgeschwindigkeit sollte möglichst langsam sein, so dass Bakterien auch noch im distalen Colon, wo sich die meisten Colonekarzinome entwickeln, auf die Substanzen zurückgreifen können.

Als weiteres funktionelles Kohlenhydrat wurde in der vorliegenden Arbeit ein PS aus Resistenter Stärke (RS) bzw. Fermentationsprodukte davon verwendet. Wie bei den Isomaltulose-Derivaten auch sollte der Fermentationsprozess im Dickdarm verlangsamt sein, so dass noch im distalen Colon SCFA entstehen. RS wird definiert als die Gesamtheit an Stärke und Stärke-Abbauprodukten, die in den menschlichen Dickdarm gelangt. RS wird in vier Typen eingeteilt [Englyst *et al.*, 1992; Topping *et al.*, 2003]:

- **RS1:** physikalisch unzugängliche Stärke in Zellwänden (Amyloblasten), Vorkommen in nur teilweise gemahlene Getreidekörnern und Samen
- **RS2:** granuläre Stärke, Vorkommen in grünen Bananen, rohen Kartoffeln und Hülsenfrüchten
- **RS3:** retrogradierte oder kristalline, nicht granuläre Stärke. Vorkommen in gekochten und wieder abgekühlten Kartoffeln, Brotkrusten, Cornflakes.
- **RS4:** chemisch modifizierte oder repolymerisierte Stärken.

RS wird im Dickdarm fermentiert und hat, je nach Nahrungsquelle, unterschiedlichen Einfluss auf die Colonfunktion: Bei gesunden Probanden wurde sowohl eine Zunahme

des Stuhl-Feuchtgewichts als auch der Stuhl-Trockenmasse festgestellt. RS2 erhöhte die Transitzeit; jedoch waren diese Effekte geringer als nach Einnahme von NSP mit Weizenkleie. Alle RS-Typen erhöhten die SCFA-Konzentration im Stuhl, wobei vor allem RS2 aus Kartoffeln die Butyrat-Konzentration steigern konnte [Cummings *et al.*, 1996]. Bei Ileostomie-Probanden führte eine nachträgliche Fermentation des Ileostomie-Abflusses mit Faeces nach Gabe von RS2 aus grünen Bananen zu signifikant erniedrigtem pH und erhöhten Acetat- und Butyrat-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe [Langkilde *et al.*, 2002]. Eine Kombination von Weizenkleie mit RS führte bei gesunden Probanden zu einem signifikant verminderten pH-Wert des Stuhls, ein Effekt, der bei alleiniger Weizenkleie-Gabe nicht auftrat. Ebenso erfolgte nur bei der Weizenkleie/RS-Gruppe eine signifikant erhöhte Acetat- und Butyrat-Ausscheidung [Muir *et al.*, 2004]. Bei Schweinen führte die Verfütterung von RS aus Kartoffeln im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl zu einer signifikanten Absenkung des pH-Werts in Faeces als auch zu einer erhöhten Butyrat-Konzentration. Die Anzahl apoptotischer Zellen war insgesamt in der RS-Gruppe vermindert, begleitet von einer vermehrten Bcl-2- und verminderten Bak-Expression. Die Lokalisation apoptotischer Colonekryptenzellen verschob sich von der luminalen Zone zur Stammzellregion [Mentschel & Claus, 2003].

2.4 Zielsetzung

Für die vorliegende Arbeit sollten neuartige Oligosaccharide und deren *in vitro*-Fermentationsprodukte hinsichtlich ihrer cytotoxischen, proliferationshemmenden und apoptoseinduzierenden Wirkung bei Colonekrypten-Zelllinien untersucht werden. Zusätzlich wurde der Einfluss dieser Substanzen auf den Zellzyklus geprüft. Es wurden drei Colonekrypten-Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad verwendet: undifferenzierte Adenocarcinom-Zellen (HT29), ein aus HT29-Zellen mit Hilfe von Na-Butyrat differenzierter permanenter Clon (HT29 Clon 19A-Zellen) und T84-Zellen, die morphologisch Kryptenzellen ähneln und zu gerichtetem Elektrolyttransport fähig sind. Ziel war es, Oligosaccharide zu entwickeln, die so langsam fermentiert werden, dass eine Metabolisierung durch Bakterien auch noch in distalen Dickdarmabschnitten stattfinden kann, wo am häufigsten Colonekryptenkarzinome entstehen. Die Kohlenhydrate wurden zur Überprüfung des bei der bakteriellen Fermentation entstehenden Musters an kurzkettigen Fettsäuren *in vitro* mit Humanfaeces inkubiert. Sowohl die dabei entstandenen

Fermentationsüberstände als auch analoge Gemische der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat zur Überprüfung des spezifischen Fettsäureeffekts wurden im Zellkulturmodell (s.o.) untersucht. Bei der Fermentierung der Oligosaccharide sollten möglichst günstige SCFA-Muster entstehen, die einen proliferationshemmenden und apoptoseinduzierenden Effekt bei den verschiedenen Colonicarcinom-Zelllinien ausüben. Mit Hilfe des für diese Arbeit etablierten Untersuchungspanels sollte für zukünftige Untersuchungen ein effektives Screening neu synthetisierter Oligo- und Polysaccharide ermöglicht werden. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sollten Hinweise darauf geben, welche Substanzen präventiv auf die Colonicarcinogenese wirken und auf Grund dieser Ergebnisse zukünftig in größerem Maßstab für humane Interventionsstudien hergestellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysenwaage „Sartorius Basic“ (Sartorius AG, Göttingen)

Begasungsbrutschrank „Heraeus BB6220“ (Heraeus Instruments, Fellbach)

Durchflusscytometer „FACSCalibur“ (Becton Dickinson, Heidelberg)

Elektronische Pipetten „Eppendorf Response 4850“ 100 µl, 500 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Inverses Mikroskop „Nikon TMS“ (Nikon, Tokio, Japan)

Micro-Osmometer „The Advanced™ 3MO plus“ (Advanced Instruments, Inc., Norwood, Massachusetts, U.S.A.)

Mikrotiterplatten-Reader „THERMOmax“ (Molecular Devices GmbH, Graefelfing)

Multipette 4780 (Eppendorf, Hamburg)

Ohmmeter „Endohm™“ (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, U.S.A.)

Phasenkontrastmikroskop „Leica DMLS“ (Leica, Wetzlar)

pH-Meter „Knick Calimatic 761“ (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin)

Pipettierhilfe „pipetus®-standard“ (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

Sterile Werkbank LaminAir® HB 2472 (Heraeus Instruments, Fellbach)

Tischzentrifuge CR 422 (Jouan, Unterhaching)

Variable Pipetten „Eppendorf Research“ 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Vertikales Diffusionskammersystem (Corning Costar Germany, Bodenheim)

Vortex VF2 (IKA-Werke Janke & Kunkel, Staufen)

Wasserbad „Thermomix B“ (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Zählkammer Neubauer, geeicht (Karl Hecht KG, Sondheim)

3.1.2 Software

CELLQuest™ Mess- und Auswertesoftware für FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)

Auswertesoftware „Acquire & Analyze“ für Vertikale Diffusionskammern (Physiological Instruments, Houston, Texas, U.S.A.)

Auswertesoftware ModFit *LT*™ Version 2.0 for Mac (Verity Software House, Inc., Topsham, U.S.A.)

Auswertesoftware SOFTmax® for Windows™, Version 2.31 (Molecular Devices GmbH, Graefelfing)

Software zur Kompensation des Durchfluscytometers FACSComp (Becton Dickinson, Heidelberg)

3.1.3 Chemikalien, Zellkulturmedien und –zusätze

4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure (HEPES) (Merck KGaA, Darmstadt)

Active Caspase-3 Antibody Apoptosis Kit (BD PharMingen, Heidelberg)

Annexin V-Fluos (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Calciumchlorid-Dihydrat $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt)

CaliBRITE™ Beads zur Kompensation des Durchfluscytometers (Becton Dickinson, Heidelberg)

Carbachol (Carbamoylcholin-Chlorid) (Calbiochem, Bad Soden)

Clinitrol 290 Reference Solution (Advanced Instruments, Norwood, Massachusetts, U.S.A.)

Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose (Invitrogen, Karlsruhe)

Essigsäure (Eisessig) 100% (Merck KGaA, Darmstadt)

Ethanol p.a. (Roth, Karlsruhe)

FACSClean™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSComp™ Beads zur Kompensation des Durchfluscytometers (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSRinse™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

Foetales Kälberserum (FCS) (Invitrogen, Karlsruhe)

D(+)-Glucose (Merck KGaA, Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt)

D-Mannit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanol p.a. (Roth, Karlsruhe)

Mycofluor™ Mycoplasma Detection Kit (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande)

Natriumacetat (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumbutyrat (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumchlorid NaCl (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3 (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumpropionat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Nutrient Mixture Ham's F-12 (Invitrogen, Karlsruhe)

Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Natriumbicarbonat (Invitrogen, Karlsruhe)

Penicillin / Streptomycin (5000 Einheiten Penicillin / 5000 $\mu\text{g/l}$ Streptomycin) (Invitrogen, Karlsruhe)

Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium, ohne Natriumbicarbonat (Invitrogen, Karlsruhe)

Propidiumiodid (PI) (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande)

Prostaglandin E_2 (PgE_2) (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden)

Ribonuclease A (Rnase) Type XII-A from Bovine Pancreas (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Staurosporin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Trypanblau-Lösung 0,4% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Trypsin / EDTA (2,5 g/l Trypsin, 0,38 g/l EDTA) (Invitrogen, Karlsruhe)

Trypsin / EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g EDTA/l) (Invitrogen, Karlsruhe)

WST-1 Cell Proliferation Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim)

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Mikrotiterplatten (96-well) mit Flachboden „Cellstar®“, steril, mit Deckel (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

Multipettenaufsätze, steril, 2,5 ml und 5 ml (Brand, Wertheim)

Multischalen 24-well (Corning Costar Germany, Bodenheim)

Multischalen mit 6 Vertiefungen „Nunclon™ Δ Surface“ (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)

Pipettenspitzen 20 µl (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen 50-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen 2-200 µl (Eppendorf, Hamburg)

Polystyrolröhrchen 12x75 mm, steril mit Deckel (Becton Dickinson, Heidelberg)

Reaktionsgefäße 1,5 ml „Safe Lock“ (Eppendorf, Hamburg)

Reaktionsgefäße 2,0 ml „Safe Lock“ (Eppendorf, Hamburg)

Serologische Pipetten „Advantage“, steril, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (BD Falcon™, Heidelberg)

Snapwell, Polycarbonat, 0,4 µm Porengröße (Corning Costar Germany, Bodenheim)

Spritzenvorsatzfilter „ecoLab“ steril, Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Zellkulturflaschen T₂₅ (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)

Zellkulturflaschen T₂₅ „Nunclon™ Δ Surface“ (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)

Zellkulturflaschen T₇₅ (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)

Zellkulturflaschen T₈₀ „Nunclon™ Δ Surface“ (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)

Zentrifugenröhrchen Polypropylen 15 ml, steril (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

Zentrifugenröhrchen Polypropylen 50 ml, steril (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

3.1.5 Zelllinien

HT29 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig): Die Zellen wurden 1964 von J. Fogh aus dem Colonadenocarcinom einer 44-jährigen Frau isoliert. Unter Standard-Kulturbedingungen (Medium mit hohem Glucosegehalt und Zusatz von FCS) sind HT29-Zellen undifferenziert und wachsen als Multilayer unpolare Zellen [Rousset, 1986]. Unter modifizierten Kulturbedingungen ist eine Enterozyten-ähnliche Differenzierung möglich, so z. B. in glucosefreiem Medium mit Zusatz von Galactose [Pinto *et al.*, 1982] oder Inosin [Chantret *et al.*, 1988]. Differenzierungsmerkmale sind z. B. das Wachstum als polare Monolayer mit Ausbildung von Tight Junctions und gerichteten Transportvorgängen, Dombildung, Bildung eines Bürstensaums mit Mikrovilli und Expression von Bürstensaum-Hydrolasen [Zweibaum *et al.*, 1991].

HT29 Clon 19A (zur Verfügung gestellt von C. Laboisse): HT29 Clon 19A-Zellen entstanden durch Differenzierung von HT29-Zellen mit Natriumbutyrat [Augeron & Laboisse, 1984]. Sie wachsen nach Erreichen der Konfluenz als polarisierte Monolayer und bilden Tight Junctions aus [Zweibaum *et al.*, 1991].

T84 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig): T84-Zellen sind Coloncarcinom-Zellen, die aus den Lungenmetastasen eines Patienten isoliert wurden. Die Zellen wurden BALB/c-Nacktmäusen subkutan injiziert und dann aus den sich dort manifestierenden Tumoren gewonnen [Murakami & Masui, 1980]. Sie wachsen als polare Monolayer und bilden Tight Junctions und Dome aus [Zweibaum *et al.*, 1991]. Konfluente Monolayer, die auf permeablen Membranen kultiviert wurden, können einen gerichteten Elektrolyttransport aufrechterhalten und besitzen Rezeptoren für einige Neurotransmitter und Peptidhormone, z. B. VIP (Vasoaktives Intestinales Polypeptid), Carbachol und Somatostatin [Dharmasathaphorn *et al.*, 1984].

3.1.6 Oligosaccharide

Von der Firma Südzucker wurde eine Vielzahl an zum Teil neu entwickelten Poly- und Oligosacchariden zur Verfügung gestellt. Für diese Arbeit wurden im Wesentlichen die

folgenden Substanzen verwendet, aus denen auch Fermentationsüberstände gewonnen wurden (s. 3.2.1):

- BC-O 165:** hydriertes Kondensationsprodukt aus Palatinose®, bestehend aus den Einheiten Glucose, Sorbitol, Mannitol und Fructose, Verzweigungsgrad 4-10.
- BC-O 299:** Kondensationsprodukt aus Palatinose®, bestehend aus Glucose und Fructose, Verzweigungsgrad 2.
- BC-P 114:** Resistente Stärke, gewonnen aus Maisstärke, Typ 2, Verzweigungsgrad >1000.

Genauere Spezifikationen der Substanzen sind leider nicht möglich, da zum Teil Patentverfahren anhängig sind.

3.1.7 Lösungen

Inkubationspuffer für Annexin V

10 mM HEPES mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
140 mM NaCl
5 mM CaCl₂
In 500 ml H₂O bidest.
Lagerung bei +4 °C

SCFA-Gemische in PBS

Natriumacetat, Natriumpropionat und Natriumbutyrat wurden entsprechend den Konzentrationen in den FÜ abgewogen, auf 100 ml mit PBS aufgefüllt und durch 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter in sterile 50 ml-Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert. Lagerung bei +4 °C.

Propidiumiodid-Lösung für Annexin V und Zellzyklusuntersuchungen

50 µg PI/ml wurde in H₂O bidest. gelöst und gut gemischt. Aufbewahrung bei +4 °C lichtgeschützt.

Markierungslösung für Annexin V

Für 10 Ansätze:

500 µl	Inkubationspuffer
10 µl	Propidiumiodid-Lösung
10 µl	Annexin V-Fluos-Lösung

Unmittelbar vor Gebrauch ansetzen, vor Licht schützen.

Ringer-LösungStammlösungen:

Stock A	2,4 mM NaCl
Stock B	0,5 M NaHCO ₃
Stock C	66,6 mM KH ₂ PO ₄
	16,6 mM K ₂ HPO ₄
Stock D	24 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O
	24 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O
Glucose Stock	0,5 M Glucose

Für 1 l Ringer-Lösung wurden jeweils 50 ml der Stock-Lösungen A, B, C und D in dieser Reihenfolge gemischt, 20 ml Glucose-Stock dazugegeben und mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Lagerung bei +4 °C.

In vitro-Fermentationsmedium (Angaben der Firma Südzucker)

Trypton	1,5 g
Hefeextrakt	1,0 g
KH_2PO_4	0,24 g
Na_2HPO_4	0,24 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,24 g
NaCl	0,48 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
Resazurin	1,0 mg
Cystein/HCl	0,5 g
Vitaminlösung (nach DSM 141)	0,5 ml
Spurenelementelösung (nach DSM 141)	9,0 ml
NaHCO_3	2,0 g
H_2O dest.	ad 1000 ml
pH-Einstellung auf pH 7,0	

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der Fermentationsüberstände

Die Fermentationsüberstände (FÜ) wurden von der Firma Südzucker zur Verfügung gestellt. Laut Herstellungsangaben von Südzucker wurden 9,0 ml des *in vitro*-Fermentationsmediums (s. 3.1.7) mit 0,5 % (w/v) des zu testenden Oligosaccharids versetzt. Anschließend wurde das Medium-Oligosaccharid-Gemisch mit 1,0 ml einer 10 %igen Faecessuspension in anaerobem 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), dem 0,5 g Cystein/HCl als Reduktionsmittel zugesetzt wurden, beimpft. Die Faecesproben bestanden aus Mischfaeces dreier Probanden, die zehn Tage vor Faecesgewinnung täglich ca. 20 g Weizenkleie in Joghurt (verteilt auf eine Portion morgens und eine Portion abends) zu sich nehmen mussten, ansonsten war die Ernährung beliebig. Präbiotika durften nicht eingenommen werden. Die Stuhlproben wurden innerhalb von 30 min nach Gewinnung im Labor verarbeitet. Für die Fermentation wurde Faeces aus der Mitte der Probe, der noch nicht mit Luftsauerstoff in Berührung gekommen war, verwendet. Der Fermentationsansatz erfolgte in Hungate-Röhrchen, je nach Oligosaccharid über 14-48 h, unter Schütteln bei 37 °C. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden aus dem Fermentationsansatz Proben entnommen und diese auf den Restanteil an Oligosacchariden, auf SCFA und pH-Wert untersucht.

Nach beendetem Fermentationsprozess wurden 50 ml der Fermentationsflüssigkeit für 20 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mittels eines 0,25 µm-Filters steril in eine zuvor autoklavierte, mit Butylgummistopfen verschlossene, Serumflasche filtriert. Bis zum Versand wurden die FÜ bei -20 °C gelagert, der Versand erfolgte auf Trockeneis.

Nach der Ankunft wurden die FÜ bei Raumtemperatur aufgetaut. Da eine deutliche Trübung feststellbar war, wurden die Überstände nochmals durch 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Nach der Filtration waren die Überstände klar und von gelblicher bis hellbrauner Farbe. Die Aliquots wurden vor Versuchsbeginn jeweils frisch aufgetaut.

3.2.2 Analyse der Fermentationsüberstände

Flüchtige organische Säuren (C_1 - C_8) wurden von der Firma Südzucker mittels Headspace-Gaschromatographie bestimmt. Laut Arbeitsanleitung von Südzucker wurden die Säuren mit Methanol säurekatalysiert in die entsprechenden Methylester überführt. Diese wurden gaschromatographisch aus dem Dampfraum (GC-Headspace) unter Verwendung von Chloressigsäure als internem Standard bestimmt. Als Standardstammlösung diente ein Gemisch aus organischen Säuren, die mit Reinstwasser zu Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen verdünnt wurden. Die Massenkonzentrationen (mg/kg) der flüchtigen organischen Säuren wurden durch Vergleich der Peakflächen-Verhältnisse der jeweiligen Säure und Chloressigsäure für Probe- und Referenzlösungen bestimmt. Hierfür wurde eine Kalibrierkurve (linear durch Null) angefertigt, die aus den Standardlösungen verschiedener Konzentrationen resultierte.

Die Osmolalität der Fermentationsüberstände wurde über Gefrierpunktserniedrigung mit einem Osmometer bestimmt. Vor jeder Messung wurde mit einer Referenzlösung (290 mOsm/kg) die Funktion des Osmometers überprüft. Bei einer Doppelbestimmung durften beide Messergebnisse nicht mehr als ± 2 mOsm/kg vom Sollwert abweichen.

3.2.3 Herstellen der WST-1-Gebrauchslösung

Die vom Hersteller gelieferte WST-1-Stammlösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert und vor der Verwendung jeweils frisch aufgetaut. Zum Einsatz im Cytotoxizitäts- und Proliferationstest wurde die Stammlösung unmittelbar vor Gebrauch 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt und gut gemischt.

3.2.4 Routine-Zellkultur

Alle Medien, PBS und Trypsin zur Zellkultivierung wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

HT29- und HT29 Clon 19A-Zellen wurden in T_{80} -Zellkulturflaschen unter Standardkulturbedingungen (95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2) in DMEM unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) kultiviert. Zur Subkultivierung bei Konfluenz wurden die Zellen 3 mal mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) gespült, um Mediumreste zu entfernen. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erfolgte mit Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g EDTA/l) bei 37 °C. Der Trypsinierungsprozess

wurde nach Ablösen der Zellen (durchschnittliche Dauer 5-7 min) von der Kulturfläche mit frischem Medium abgestoppt, die Zellen in Medium gut suspendiert und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet wieder in 10 ml frischem Medium suspendiert und von dieser Suspension wurde ein Aliquot im Verhältnis 1:10 mit frischem Medium in eine neue T₈₀-Flasche ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

T84-Zellen wurden ebenfalls unter Standard-Kulturbedingungen in T₇₅-Zellkulturflaschen in einem Gemisch von DMEM und Nutrient Mixture Ham's F12 (Mischungsverhältnis 1:1) unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen drei mal mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) gespült und mit Trypsin/EDTA (2,5 g/l Trypsin; 0,38 g/l EDTA) bis zum Ablösen der Zellen von der Kulturfläche bei 37 °C inkubiert. T84-Zellen zeigen eine stärkere Adhärenz als HT29- und HT29 Clon 19A-Zellen, deshalb musste Trypsin/EDTA in höherer Konzentration verwendet werden und der Vorgang des Trypsinierens dauerte länger (durchschnittlich 10-12 min). Anschließend wurde der Trypsinierungsprozess durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die in 10 ml frischem Medium suspendierten Zellen in einem Verhältnis von 1:3 (Zellsuspension : Medium) ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte ebenfalls alle 2-3 Tage.

Die in Kultur befindlichen Zellen wurden regelmäßig mittels eines fluoreszenzmikroskopischen Mykoplasmentests auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Ein Befall mit Mykoplasmen wurde während der gesamten Studiendauer nicht festgestellt.

Die Zellen befanden sich für höchstens 15 Passagen in Kultur und wurden dann durch frische kryokonservierte Zellen ersetzt.

3.2.5 Zellzählungen und Vitalitätsbestimmungen

Zellzählungen erfolgten in einer geeichten Neubauer-Zählkammer in einem Gemisch aus Zellsuspension und Trypanblau. Ausgezählt wurden jeweils vier Eckquadrate (4 x 16 Kleinquadrate). Dabei wurde zwischen vitalen und nekrotischen Zellen unterschieden. Vitale Zellen färben sich aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht mit Trypanblau an. Durch die geschädigte Zellmembran nekrotischer Zellen kann der blaue Farbstoff in das Zellinnere eindringen. Dort bindet er an Proteine im Cytoplasma und

im Zellkern. Apoptotische Zellen färben sich mit Trypanblau nicht an. Lediglich bei spätapoptotischen Zellen, die aufgrund ihrer morphologischen Besonderheiten (z. B. Ausbildung apoptotischer Blebs) im Mikroskop bei der Zellzählung erkannt werden können, ist zum Teil eine diffuse, hellblaue Färbung erkennbar.

Aus den Zählergebnissen der vier Eckquadrate wurde ein Mittelwert gebildet. Durch das Volumen eines Eckquadrates von 0,1 µl ergibt sich für die Zellzahl folgende Berechnungsformel:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{gezählte Zellen (Mittelwert)} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Anteil der nekrotischen Zellen wurde prozentual vom Anteil der vitalen Zellen berechnet.

3.2.6 Cytotoxizität

Für die Cytotoxizitätsversuche wurden 70.000 vitale Zellen/Vertiefung (HT29 und HT29 Clon 19A) bzw. 150.000 vitale Zellen/Vertiefung (T84) in 96-well-Platten mit Flachboden in einem Volumen von 100 µl Komplettmedium ausgesät. Die äußeren Randvertiefungen der Platte wurden mit jeweils 200 µl PBS befüllt, um während der Inkubationszeit Volumenverluste durch Verdunstung zu minimieren. Am dritten Tag nach Aussaat waren die Zellen zu 90-100 % konfluent. Das Medium über dem Zellrasen wurde abgesaugt und FÜ bzw. SCFA-Gemische in verschiedenen Verdünnungen in Komplettmedium auf die Zellen pipettiert (Volumen 100 µl). Als Kontrolle diente Zellkulturmedium ohne Zusätze. Jede Verdünnung wurde in Dreifachbestimmung innerhalb eines Versuchs durchgeführt.

Nach 24 h Inkubationszeit mit den Testsubstanzen wurde der Überstand über dem Zellrasen abgesaugt und in jede Vertiefung 100 µl WST-Gebrauchslösung (s. 3.2.3) pipettiert. Zusätzlich wurden in zwei Vertiefungen, in die keine Zellen ausgesät wurden, jeweils 100 µl der WST-Gebrauchslösung als Leerwert pipettiert. Die Platten wurden zur Farbstoffentwicklung für 10 min (HT29 und HT29 Clon 19A) bzw. für 30 min (T84) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ (Standard-Zellkulturbedingungen) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Farbstoffentwicklung sofort in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

Messparameter: Messung gegen Leerwert bei 460 nm, Referenzwellenlänge >600 nm.

Für die Auswertung wurde die Extinktion des Leerwerts von den Extinktionen der jeweiligen Proben abgezogen.

3.2.7 Proliferation

Für die Proliferationsversuche wurden 4.000 vitale Zellen (HT29 und HT29 Clon 19A) bzw. 14.000 vitale Zellen (T84) in einem Volumen von 100 µl in Kompletmedium in die Vertiefungen von 96-well-Platten mit Flachboden ausgesät. In die äußeren Randvertiefungen der Platte wurden 200 µl PBS pipettiert, um während der Inkubationszeit Volumenverluste durch Verdunstung zu minimieren. Für jeden Proliferationstest wurden vier Platten ausgesät, da jeweils eine Platte an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 7 der Inkubationsphase gemessen wurde. Am Tag nach der Zellaussaat (als Tag 0 definiert) erfolgte der Mediumwechsel mit jeweils 100 µl der Substanzverdünnungen. Als Bezugswert wurde pro Platte eine Mediumkontrolle mitgeführt. Der genaue Versuchsverlauf ist in Tab. 2 schematisch dargestellt, die Messung der Farbstoffentwicklung mit WST-1 wurde wie unter 3.2.6 beschrieben durchgeführt. Jede Substanzkonzentration wurde innerhalb eines Assays in Dreifachbestimmung gemessen.

Tab. 2: Schema zum Versuchsverlauf des Proliferationstests

Platte Nr.	Tag 0	Tag 2	Tag 5	Tag 7
1	Messung			
2	Mediumwechsel	Messung		
3	Mediumwechsel	Mediumwechsel	Messung	
4	Mediumwechsel	Mediumwechsel	Mediumwechsel	Messung

3.2.8 Apoptose

3.2.8.1 Annexin V

Für Annexin V, Caspase-3 und Zellzyklusuntersuchungen konnten die Zellen eines Versuchsansatzes verwendet werden. Dazu wurden $1,2 \times 10^6$ vitale Zellen (HT29 und HT29 Clon 19A) bzw. $1,8 \times 10^6$ vitale Zellen (T84) pro Vertiefung in 6-well-Multischalen in einem Volumen von 2 ml Kompletmedium ausgesät. Nach drei Tagen Inkubationszeit waren die Zellen zu ca. 80-90 % konfluent und es erfolgte ein Mediumwechsel mit FÜ bzw. SCFA-Gemischen in einer Konzentration von 50 % in Kompletmedium, da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass geringere Konzentrationen keine signifikanten apoptoseinduzierenden Effekte hatten. Als Positiv-Kontrolle diente ein Ansatz mit $0,5 \mu\text{M}$ Staurosporin in Kombination mit $0,5 \mu\text{M}$ Brefeldin A, als Negativ-Kontrolle Kompletmedium. Staurosporin und Brefeldin A sind bekannte Apoptoseinduktoren. Beide induzieren Apoptose *p53*-unabhängig in verschiedenen Zelllinien. Staurosporin wirkt über eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC) [Shao *et al.*, 1996; Shao *et al.*, 1997]. Es bewirkt außerdem einen Zellzyklusarrest über eine CDK-Hemmung, je nach Zelllinie entweder in der G1- und/oder in der G2-Phase [Qiao *et al.*, 1996; Senderowicz & Sausville, 2000; Heerdt *et al.*, 2000]. Brefeldin A verstärkt die Wirkung von PKC-Hemmern wie Staurosporin [Shao *et al.*, 1996]. Es wirkt über die Blockierung der Faltung von Proteinen und ihres Transports im Endoplasmatischen Retikulum [Rao *et al.*, 2001]. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand über dem Zellrasen abpipettiert und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden 2 mal mit 1 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (37°C) gespült, die Spülflüssigkeit wurde zu den Mediumüberständen in die Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit $250 \mu\text{l}$ des entsprechenden Trypsins (s. 3.2.4) bei 37°C bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Dabei wurde der Trypsinierungsprozess genau beobachtet und sofort mit 1 ml Kompletmedium abgestoppt, wenn mikroskopisch ein Abrunden der Zellen zu sehen war, da eine unnötig lange Einwirkzeit von Trypsin zu erhöhten Apoptose- und Nekroseraten führen kann. Die abgelösten Zellen wurden vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspendiert und ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen zu Mediumüberstand und Spülflüssigkeit gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei $200 \times g$. Der Überstand über dem Zellpellet wurde abgesaugt und die

Zellen in 1 ml Komplettmedium resuspendiert. Aus einem Aliquot dieser Zellsuspension wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt.

Phosphatidylserin (PSer) ist ein negativ geladenes Phospholipid, das sich bei apoptotischen Zellen von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran verlagert (s. 2.2.5). Das FITC-markierte Protein Annexin V bindet spezifisch in der Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an PSer [Vermes *et al.*, 1995]. Zur Diskriminierung nekrotischer Zellen wurde eine simultane Färbung mit PI durchgeführt, das die defekte Membran nekrotischer Zellen durchdringt und die DNA anfärbt. Für den Annexintest wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 12 x 75 mm-Polystyrolröhrchen pipettiert, 1 ml kaltes PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Röhrchen wurden anschließend bei 250 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen nochmals mit 1 ml PBS gewaschen. Auf das Zellpellet wurden 50 μl der Markierungslösung (s. 3.1.7) pipettiert und der Ansatz für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Färbeanatz wurden dann 400 μl Inkubationspuffer (s. 3.1.7) gegeben, vorsichtig gemischt und die Röhrchen bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gestellt (höchstens eine Stunde).

3.2.8.2 Caspase-3

Die Bestimmung der Caspase-3 wurde mittels eines Kits durchgeführt, der Phycoerythrin(PE)-konjugierten Caspase-3-Antikörper enthält, Fixierungs-, Permeabilisierungs- und Waschpuffer. Aktivierte Caspase-3 ist ein Heterodimer aus 17- und 12 kDa-Untereinheiten, die aus dem 32 kDa-Proenzym hervorgegangen sind. Der Antikörper bindet spezifisch an aktivierte Caspase-3. Für den Test wurden Zellen aus dem gleichen Ansatz wie für den Annexin-Test verwendet. Die Arbeitsanleitung des Herstellers wurde modifiziert, da mit den ursprünglich vorgesehenen Volumina und Inkubationszeiten keine Permeabilisierung der Colonicarcinomzellen erreicht werden konnte. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 250 x g für 5 min. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 12 x 75 mm Polystyrolröhrchen pipettiert und zweimal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 ml Cytofix/Cytoperm-Lösung (gebrauchsfertig im Kit enthalten) suspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit 0,5 ml Perm/Wasch-Puffer gewaschen. Der Perm/Wasch-Puffer ist als 10x Konzentrat im Kit enthalten und wurde vor Gebrauch 1:10 mit H_2O bidest. verdünnt. Nach dem Waschen wurden 20 μl Antikörper-

Lösung (gebrauchsfertig im Kit enthalten) und 100 µl Perm/Wasch-Puffer auf das Zell-pellet pipettiert, der Ansatz durch Vortexen gut gemischt und über Nacht bei +4 °C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde die Antikörper-Lösung abzentrifugiert und die Zellen einmal mit 1 ml Perm/Wasch-Puffer gewaschen. Für die Messung wurden die Zellen dann abschließend in 0,5 ml Perm/Wasch-Puffer resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gestellt.

3.2.9 Zellzyklus

Die Zellzyklusmessungen wurden nach einer modifizierten Methode nach Nicoletti [Nicoletti *et al.*, 1991] durchgeführt. 1×10^6 Zellen wurden in 12 x 75 mm-Polystyrolröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (250 x g, 5 min) und einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Das PBS über dem Zellpellet wurde abgesaugt und zum Fixieren 2 ml eiskalter Ethanol 70 % unter Vortexen zu den Zellen gegeben. Das Zell-Ethanol-Gemisch wurde bei 4 °C für 60 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (250 x g, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen 2 mal mit jeweils 1 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils bei 250 x g, 5 min). Nach Verwerfen des Überstands wurden 100 µl RNase A-Lösung (100 µg/ml) zu den Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Färbung 400 µl Propidiumiodid-Lösung zugegeben (50 µg PI/ml) und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden bis zur Messung auf Eis gestellt.

3.2.10 Messung am Durchfluscytometer

Die Durchfluscytometrie ist ein Messverfahren zur Beurteilung physikalischer und/oder chemischer Eigenschaften von Partikeln (z.B. Zellen, Zellkerne, Hefen, Bakterien) in wässriger Suspension. Die Trägerflüssigkeit erzeugt einen Hüllstrom, durch den die Zellen einzeln durch den Messbereich geführt werden (hydrodynamische Fokussierung). Als Lichtquelle dient ein luftgekühlter Argonionen-Laser, der blau-grünes Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe müssen in diesem Bereich ihr Absorptionsmaximum haben. Der Laserstrahl wird durch ein Linsensystem fokussiert und trifft auf die Messzelle, durch die der Flüssigkeitsstrom mit den zu untersuchenden Partikeln geleitet wird. Das von den Partikeln emittierte

bzw. gestreute Licht wird über Spiegel, Filter und Linsensysteme zu Photodioden geleitet, die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln.

Das Streulicht beschreibt, je nach Ablenkungswinkel, unterschiedliche Partikeleigenschaften: Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, small angle scatter) wird um weniger als 2° gestreut und gibt näherungsweise die Zellgröße wieder. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, wide angle scatter) wird um ca. 90° gestreut und beschreibt die Granularität der Partikel. Das Vorwärtsstreulicht wird von der Vorwärtsstreulicht-Diode detektiert. Das Seitwärtsstreulicht wird, ebenso wie das von den Zellen emittierte Fluoreszenzlicht, von einer 90° -Sammellinse fokussiert und durch ein optisches System aus Spiegeln und Filtern geleitet. Mit dem für diese Arbeit verwendeten Durchflusscytometer (FACSCalibur™) können folgende Spektralbereiche erfasst werden:

- grün (510 – 540 nm)
- gelb (560 – 580 nm)
- orange (605 – 635 nm)
- rot (650 nm und darüber)

Das Signal des Fluoreszenzlichts muss über Photonenvervielfacher-Röhren (Photomultiplier-Tubes, PMT) verstärkt werden. Die elektrischen Ströme werden verstärkt und durch Analog-Digital-Wandler (ADC) digitalisiert [Shapiro, 1994].

Die Justierung der Instrumenteneinstellung, die Einstellung der Fluoreszenzkompensation und die Geräteempfindlichkeit wurden regelmäßig vor den Messungen mit mit fluoreszenzmarkierten Kontrollbeads überprüft.

Bei den vorbereiteten Proben (s. 3.2.8 und 3.2.9) wurden gemessen:

Annexin:

- Zellgröße (FSC)
- Zellgranularität (SSC)
- Annexin V-FITC (FL1: Grünfluoreszenz, 530 nm Bandpassfilter)
- PI (FL2: Orangefluoreszenz, 585 nm Bandpassfilter)

Caspase-3:

- Zellgröße (FSC)
- Zellgranularität (SSC)
- PE (FL2: Orange fluoreszenz, 585 nm Bandpassfilter)

Zellzyklus:

- Zellgröße (FSC)
- Zellgranularität (SSC)
- PI (FL3: Rot fluoreszenz, 585 nm Bandpassfilter)

Bei der Datenakquisition für die Zellzyklusanalyse müssen folgende Punkte besonders beachtet werden:

- Es müssen mindestens 20.000 Ereignisse gemessen werden, um genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen [Brown *et al.*, 1996].
- Für die Datenakquisition sollen keine Gates gesetzt werden. Debris wird erst im Analysenprogramm ausgeschlossen, Aggregate werden ebenfalls vom Analysenprogramm automatisch erfasst.
- Der diploide G0/G1-Peak soll bei der Messung immer an derselben Position sein (hier: Kanal 200 der linearen FL2-Skala).
- Die Messung erfolgt bei geringer Durchflussrate (150 – 200 events/sec).

3.2.11 Elektrophysiologische Untersuchungen in vertikalen Diffusionskammern (Ussing-Kammern)

Elektrophysiologische Untersuchungen waren nur mit HT29 Clon 19A- und T84-Zellen möglich, da HT29-Zellen kein konfluentes Monolayer mit polaren Zellen ausbilden. HT29 Clon 19A- und T84-Zellen wurden in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen / Snapwell in Kompletmedium ausgesät. Snapwells bestehen aus permeablen Membranen, die in die Vertiefungen einer 6-well-Multischale eingehängt werden (s. Abb. 6).

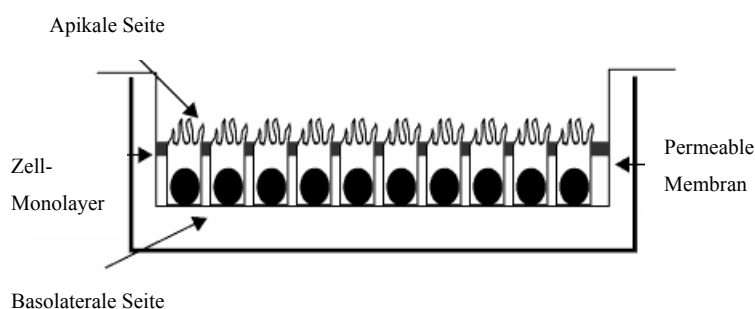


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Zell-Monolayers nach Kultivierung der Zellen auf permeablen Membranen, z. B. Snapwells.

Die Zellen, die auf den Membranen wachsen, können von apikal und von basolateral mit Medium bzw. Testsubstanzen inkubiert werden. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Ausdifferenzierung beginnt nach Erreichen der Konfluenz und ist, je nach Zelllinie, 2-3 Wochen danach abgeschlossen. Ein signifikanter transepithelialer Widerstand ist ein klarer Hinweis auf eine gleichmäßig vorhandene Differenzierung des Monolayers [Zweibaum *et al.*, 1991]. Nach ca. 4 Wochen Inkubation hatten HT29 Clon 19A- und T84-Zellen einen maximalen, stabilen transepithelialen Widerstand erreicht. Der transepitheliale Widerstand wurde vor dem Einsetzen der Snapwells in die Ussing-Kammern mit einem Ohmmeter überprüft. Bei T84-Zellen wurden maximale transepitheliale Widerstände von $600-1000 \Omega \times \text{cm}^2$ gemessen, bei HT29 Clon 19A-Zellen von $300-600 \Omega \times \text{cm}^2$.

Das vertikale Diffusionskammersystem besteht aus 6 Diffusionskammern, die in einen Heizblock eingesetzt sind und mit Carbogen begast werden. Der Heizblock wird über ein Wasserbad mit Pumpe auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ beheizt. Die Kammern bestehen aus jeweils zwei zusammensteckbaren Hälften, zwischen die die zellbewachsenen Membraneinsätze der Snapwells eingesetzt werden. Die bestückten Kammern wurden zunächst in den vorgeheizten Block eingesetzt, auf jeder Seite (apikal und basolateral) mit jeweils 5 ml auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmter Ringerlösung befüllt und jede Kammerhälfte mit einem separaten Gasanschluss verbunden. Der Gasfluss kann durch ein Nadelventil stufenlos reguliert werden. Die aufsteigenden Gasblasen bewirken eine ständige Durchmischung der Me-

dien auf beiden Seiten der Zellschicht. An jede Kammerhälfte wurde je eine Strom- und eine Spannungselektrode angeschlossen.

Nach einer Äquilibrierzeit der Zellen in Ringerlösung von 20-30 min wurden auf die mucosale Seite der Monolayer Lösungen von SCFA als Einzelsubstanzen, in verschiedenen Kombinationen und Fermentationsüberstände gegeben. Als Positiv-Kontrolle zur Überprüfung des Messsystems diente Prostaglandin E₂ bei HT29 Clon 19A-Zellen, das in 30 µM Konzentration auf die basolaterale Seite der Zellen gegeben wurde. PGE₂ erzeugt eine charakteristische Antwort der Zellen durch eine Erhöhung des Kurzschlussstroms und eine Abnahme des transepithelialen Widerstands. Für T84-Zellen wurde Carbachol in einer Konzentration von 10 µM als Positiv-Kontrolle verwendet. Carbachol ist ein Sekretagogum, das bei T84-Zellen über eine verstärkte Chloridsekretion nach basolateraler Zugabe sofort zu einem steilen Anstieg des Kurzschlussstroms führt [Dharmasathaphorn *et al.*, 1984].

3.2.12 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Programme Excel 2002 (Microsoft Corporation) und SigmaStat für Windows, Version 3.00 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Als statistische Tests wurden nach Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und auf Gleichheit der Varianzen der ungepaarte zweiseitige t-Test bzw. der Mann-Whitney-Rangsummentest angewendet. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse bzw. des Kruskal-Wallis-Tests. Angegebene Korrelationskoeffizienten sind Rang-Korrelationen nach Spearman.

Signifikanzniveaus: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit können nicht alle Ergebnisse der Vielzahl an Originalsubstanzen (OS) und Fermentationsüberständen (FÜ), die untersucht wurden, gezeigt und diskutiert werden. Es werden daher exemplarisch die wichtigsten OS und FÜ herausgegriffen: BC-P 114, BC-O 165, BC-O 299 sowie der FÜ „Kontrolle“. Beim FÜ „Kontrolle“ handelt es sich um einen Fermentationsansatz ohne Zusatz von Kohlenhydraten.

4.1 SCFA-Konzentrationen der FÜ

Die SCFA-Konzentrationen der untersuchten FÜ unterschieden sich zum Teil deutlich voneinander (s. Tab. 3). Der FÜ „Kontrolle“, der ohne Zusatz von OS hergestellt wurde, wies erwartungsgemäß die geringsten SCFA-Konzentrationen auf. Die höchsten Butyrat-Konzentrationen fanden sich im FÜ BC-O 165, hergestellt mit einem hydrierten Kondensationsprodukt aus Palatinose[®]. Um die Reproduzierbarkeit der Fermentationsprozesse zu überprüfen, wurden verschiedene Fermentationschargen hergestellt. In den Versuchen verwendet wurden die Chargen März 00 (für „Kontrolle“, BC-O 165 und BC-P 114) und Dez. 00 (für BC-O 299). Mit FÜ aus anderen Chargen wurden ebenfalls stichprobenartig Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse verschiedener Chargen unterschieden sich bei allen Testreihen (Cytotoxizität, Proliferation, Apoptose und Zellzyklus) jedoch kaum voneinander und lagen innerhalb der jeweiligen Schwankungsbereiche der Methoden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3: SCFA-Konzentrationen verschiedener Chargen von Fermentationsüberständen

	Konzentration (mmol / L)				
	Charge	FÜ Kontrolle	FÜ BC-O 165	FÜ BC-O 299	FÜ BC-P 114
Acetat	März 00	13,0	22,6	--	23,9
	Dez. 00	11,6	--	22,9	--
	April 01	12,25	30,8	27,93	--
	Sept. 01	9,3	31,8	34,3	19,7
	Feb. 02	15,5	31,8	34,1	23,8
	MW	12,3	29,3	29,8	22,5
	SD	2,3	4,5	5,5	2,4
Propionat	März 00	3,0	12,6	--	9,8
	Dez. 00	2,7	--	11,7	--
	April 01	2,62	15,35	9,51	--
	Sept. 01	2,1	11,6	9,4	8,7
	Feb. 02	3,3	15,3	14,5	13,6
	MW	2,7	13,7	11,3	10,7
	SD	0,5	1,9	2,4	2,6
Butyrat	März 00	2,8	17,2	--	8,1
	Dez. 00	3,0	--	10,1	--
	April 01	3,15	11,1	9,06	--
	Sept. 01	2,6	12,8	9,7	12,0
	Feb. 02	3,1	10,7	6,9	7,6
	MW	2,9	13,0	8,9	9,2
	SD	0,2	3,0	1,4	2,4
Σ SCFA	März 00	18,8	52,4	--	41,8
	Dez. 00	17,3	--	44,7	--
	April 01	18,02	57,25	46,5	--
	Sept. 01	14	56,2	53,4	40,4
	Feb. 02	21,9	57,8	55,5	45
	MW	18,0	55,9	50,0	42,4
	SD	2,8	2,4	5,2	2,4

-- = keine entsprechende Charge verfügbar

4.2 Cytotoxizität

Als cytotoxischer Effekt einer Testsubstanz wurde eine Vitalität der Zellen nach Inkubation mit Testsubstanzen unter 90 % im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) definiert.

4.2.1 HT29

4.2.1.1 Originalsubstanzen

HT29-Zellen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit den Originalsubstanzen BC-O 165, BC-O 299 und BC-P 114 in Konzentrationen bis zu 1 mg/ml keine cytotoxischen Effekte (Daten nicht gezeigt), nach 48 h Inkubation trat eine geringfügige Vitalitätsverminderung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium) auf, die allerdings nicht signifikant war (s. Abb. 7). Die OS BC-P 114 hatte die geringste Wirkung auf HT29-Zellen, sie unterschied sich signifikant von BC-O 299 in den Konzentrationen 0,1 und 1 mg/ml.

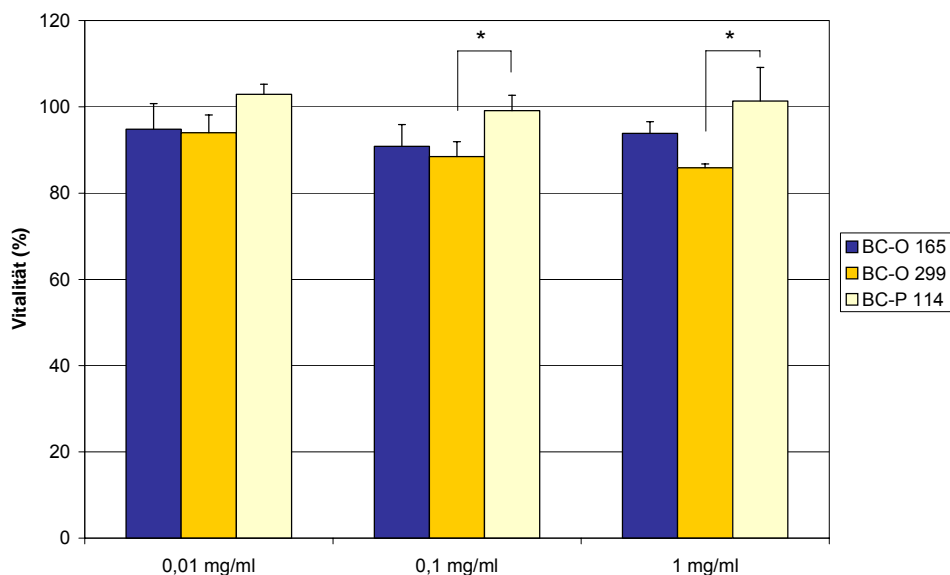


Abb. 7: Vitalitätsraten von HT29-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium=100 % Vitalität) nach 48-stündiger Inkubation mit OS in verschiedenen Konzentrationen (MW+SD, n=3-4).

Da die Effekte der verschiedenen OS sowohl im Cytotoxizitäts- als auch in Proliferations- und Apoptose-Tests äußerst gering bzw. nicht signifikant waren, wurde im folgen-

den, auch bei den Zelllinien HT29 Clon 19A und T84, auf die Darstellung der Ergebnisse mit OS verzichtet. Höhere OS-Konzentrationen als 1 mg/ml konnten nicht verwendet werden, da von der Firma Südzucker nicht genügend Material zur Verfügung gestellt werden konnte.

4.2.1.2 Fermentationsüberstände und SCFA-Gemische

Das Anaerobiermedium, das bei der Herstellung der FÜ verwendet wurde, und PBS als Lösungsmittel für die Fettsäuregemische zeigten keine cytotoxischen Effekte bei HT29-Zellen.

Alle getesteten FÜ und ihre analogen SCFA-Gemische führten nach 24-stündiger Inkubation zu einer dosisabhängigen Vitalitätsverminderung bei HT29-Zellen (s. Abb. 8 als Beispiel und Tabellenanhang Tab.A1). In den 2%igen Konzentrationen war die Vitalitätsverminderung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium) zum Teil signifikant, die Vitalität lag jedoch immer über 90%, so dass nicht von einer cytotoxischen Wirkung in dieser Konzentration ausgegangen werden kann. In der 50%igen Konzentration hatten alle FÜ außer dem FÜ „Kontrolle“ eine cytotoxische Wirkung, ebenso die korrespondierenden SCFA-Gemische (s. Abb. 9). Die Unterschiede in der cytotoxischen Wirkung zwischen den verschiedenen FÜ und SCFA-Gemischen in bestimmten Konzentrationen waren jedoch nicht signifikant.

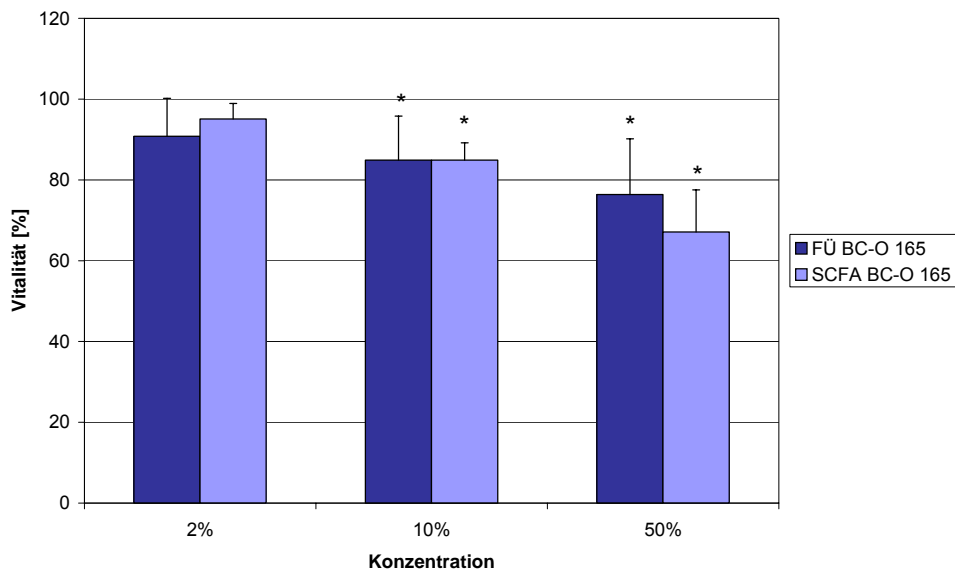


Abb. 8: Vitalitätsraten von HT29-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium=100 % Vitalität) nach 24-stündiger Inkubation mit dem FÜ bzw. dem SCFA-Gemisch BC-O 165 in verschiedenen Konzentrationen (MW+SD, n=4).

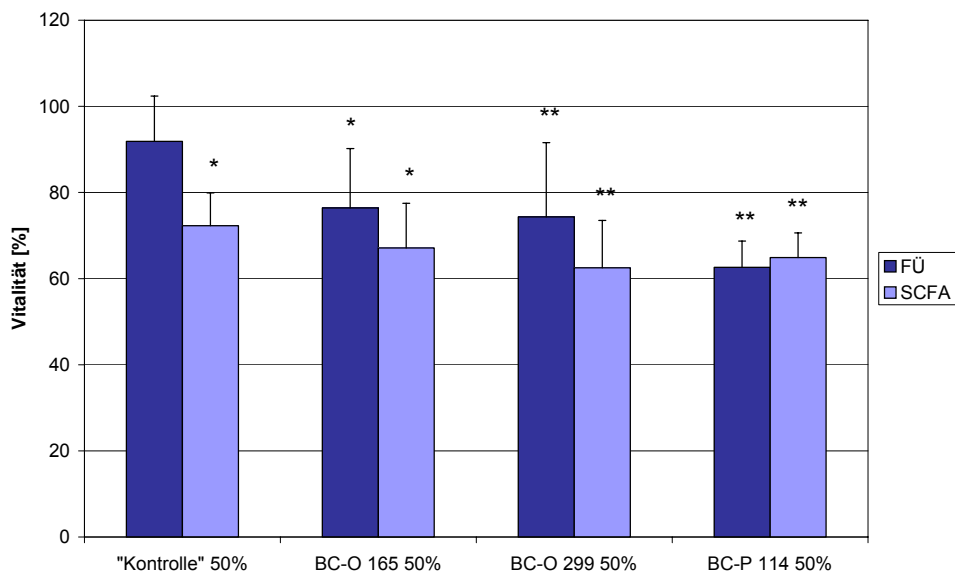


Abb. 9: Vergleich der Vitalitätsraten von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 % (MW+SD, n=3-5). Signifikante Effekte wurden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle dargestellt (Komplettmedium=100 % Vitalität).

Mit Ausnahme von BC-P 114 hatten alle analogen SCFA-Gemische in der 50%igen Konzentration eine stärkere Wirkung als die FÜ, die Unterschiede zwischen FÜ und

SCFA-Gemischen waren jedoch nicht signifikant (s. Abb. 9). Um die Ursache für die Wirkungsunterschiede von FÜ und SCFA-Gemischen zu finden, wurde das Anaerobiermedium (AM), mit dem die FÜ hergestellt wurden, mit SCFA analog dem FÜ BC-O 165 versetzt und die Ergebnisse im Cytotoxizitätstest mit denen des FÜ BC-O 165 und des SCFA-Gemischs verglichen. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den SCFA-Gemischen in PBS und zwischen den SCFA-Gemischen in AM.

Die cytotoxischen Effekte der FÜ und der SCFA-Gemische korrelierten weder mit den Konzentrationen der einzelnen SCFA noch mit der Gesamt-SCFA-Konzentration.

4.2.2 HT29 Clon 19A

4.2.2.1 Fermentationsüberstände und SCFA-Gemische

Auch bei HT29 Clon 19A-Zellen wirkten die verschiedenen FÜ und deren korrespondierende SCFA-Gemische dosisabhängig cytotoxisch (s. Abb. 10 als Beispiel). Mit Ausnahme des FÜ/SCFA-Gemisches „Kontrolle“ setzte ein signifikant cytotoxischer Effekt ab einer Konzentration von 10 % ein. Der FÜ bzw. das SCFA-Gemisch „Kontrolle“ zeigten erst ab einer Konzentration von 50 % signifikant cytotoxische Effekte.

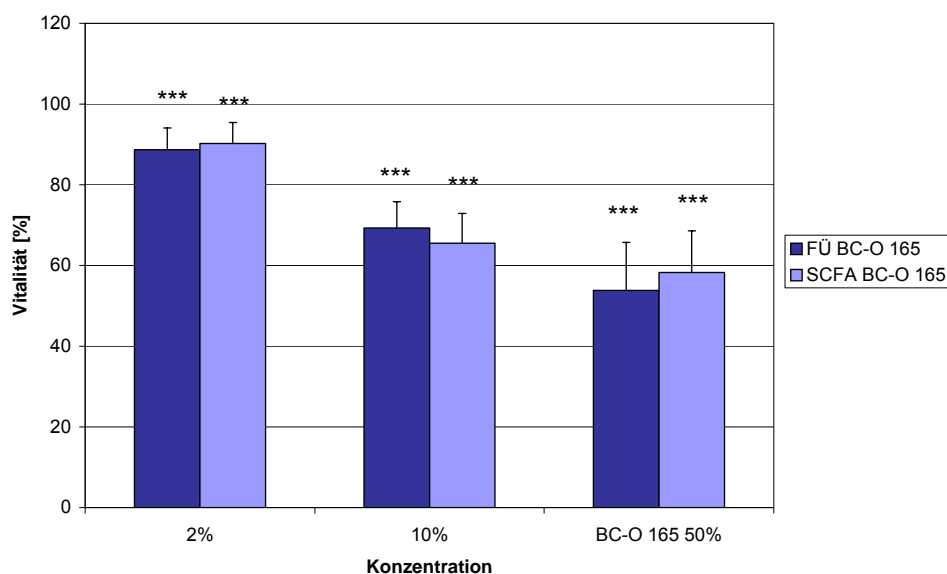


Abb. 10: Vitalitätsraten von HT29 Clon 19A-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium=100 % Vitalität) nach 24-stündiger Inkubation mit dem FÜ bzw. dem SCFA-Gemisch BC-O 165 in verschiedenen Konzentrationen (MW+SD, n=6-7).

Die FÜ und SCFA-Gemische unterschieden sich in der Konzentration 50 % nicht signifikant voneinander, in der Konzentration 10 % war allerdings der FÜ BC-O 299 signifikant cytotoxischer als der FÜ „Kontrolle“. Die SCFA-Gemische BC-O 165 und BC-O 299 waren in dieser Konzentration signifikant cytotoxischer als das SCFA-Gemisch „Kontrolle“ (s. Abb. 11).

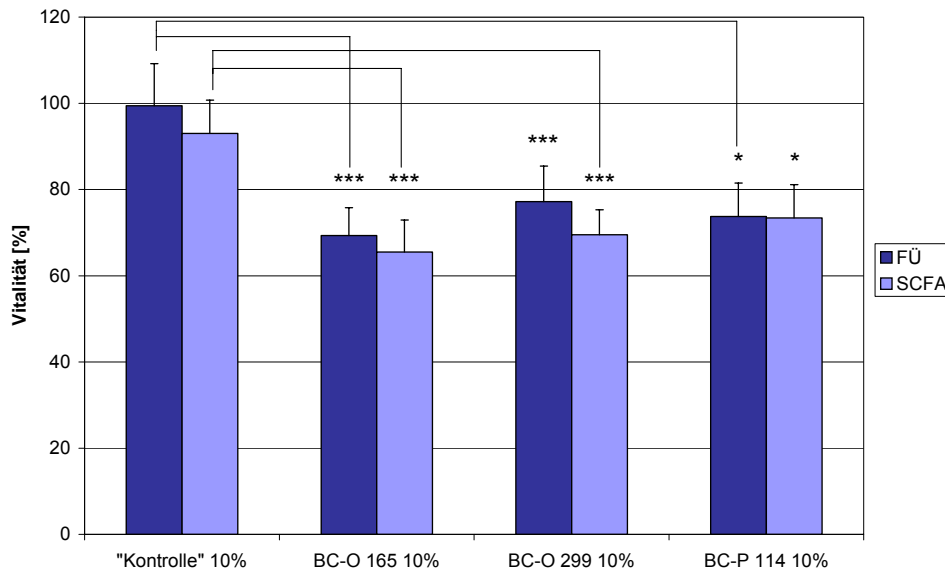


Abb. 11: Vergleich der Vitalitätsraten von HT29 Clon 19A-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 10 % (MW+SD, n=4-7). Signifikante Effekte der einzelnen FÜ/SCFA-Gemische wurden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle dargestellt (Komplettmedium=100 % Vitalität). Die Klammern bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den FÜ bzw. SCFA-Gemischen: Die FÜ „Kontrolle“, BC-O 165 und BC-P 114 sowie die SCFA-Gemische „Kontrolle“, BC-O 165 und BC-P 299 unterschieden sich mit $p \leq 0,05$ signifikant voneinander.

Die cytotoxischen Effekte der FÜ und der SCFA-Gemische korrelierten weder signifikant mit den Konzentrationen der einzelnen SCFA noch mit der Gesamt-SCFA-Konzentration.

4.2.3 T84

Bei T84-Zellen hatten die FÜ erst in der höchsten Konzentration von 50% signifikant cytotoxische Effekte, die SCFA-Gemische nur als Gemisch „Kontrolle“ in der Konzentration 50%, und hier mit 87,2 % Vitalität nur knapp unterhalb der Grenze von 90%, ab der ein cytotoxischer Effekt definiert ist (s. Abb. 12 als Beispiel).

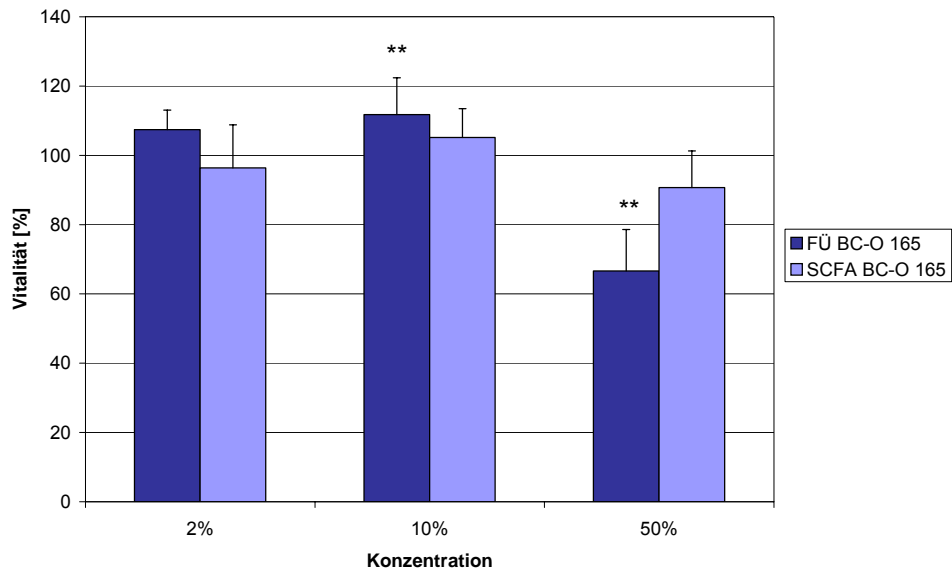


Abb. 12: Vitalitätsraten von T84-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium=100 % Vitalität) nach 24-stündiger Inkubation mit dem FÜ bzw. dem SCFA-Gemisch BC-O 165 in verschiedenen Konzentrationen (MW+SD, n=3-5).

Unterschiede in der Wirkung zwischen den einzelnen FÜ bzw. den korrespondierenden SCFA-Gemischen gab es nur bei den FÜ in der Konzentration 50% (s. Abb. 13). Hier waren die FÜ BC-O 299 und BC-P 114 signifikant cytotoxischer als der FÜ „Kontrolle“. Auch der FÜ BC-O 165 zeigte einen höheren cytotoxischen Effekt als der FÜ „Kontrolle“, der Unterschied war aber nicht signifikant.

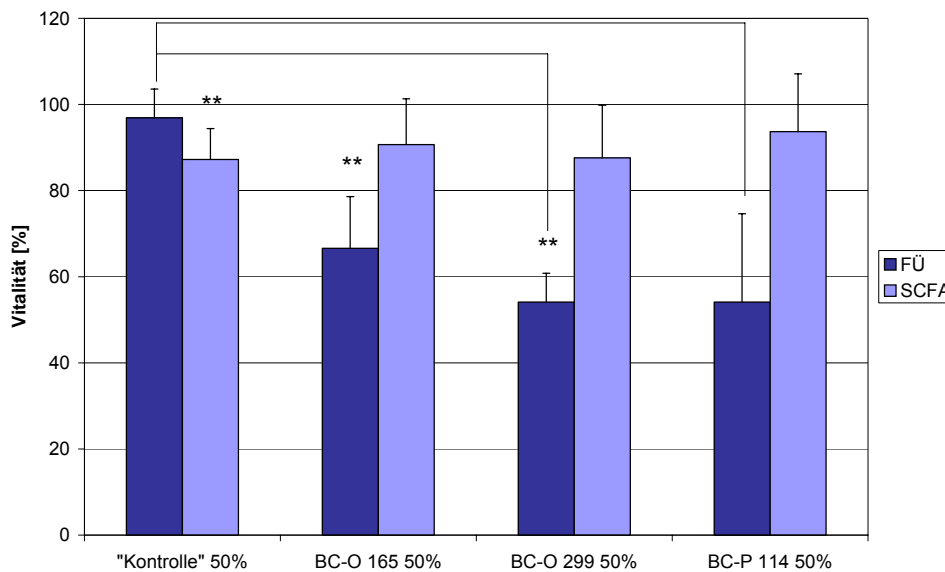


Abb. 13: Vergleich der Vitalitätsraten von T84-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 % (MW+SD, n=4-7). Signifikante Effekte der einzelnen FÜ/SCFA-Gemische wurden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle dargestellt (Komplettmedium=100 % Vitalität). Die Klammern bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den FÜ bzw. SCFA-Gemischen: Die FÜ „Kontrolle“, BC-O 299 und BC-P 114 unterschieden sich mit $p \leq 0,05$ signifikant voneinander.

Die cytotoxischen Effekte der FÜ und der SCFA-Gemische korrelierten weder signifikant mit den Konzentrationen der einzelnen SCFA noch mit der Gesamt-SCFA-Konzentration.

4.2.4 Vergleich der Zelllinien

Beim Vergleich der Zelllinien HT29, HT29 Clon 19A und T84 zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede in der Reaktion auf die getesteten FÜ und analogen SCFA-Gemische (s. Tab. 4). Am meisten unterschieden sich die Zelllinien T84 und HT29 Clon 19A: T84-Zellen reagierten weniger auf die Behandlung mit FÜ bzw. SCFA-Gemischen und zeigten nach 24-stündiger Inkubation häufig eine höhere Vitalitätsrate als HT29 Clon 19A-Zellen.

Tab. 4: Vergleich der Vitalitätsraten der Zelllinien HT29, HT29 Clon 19A und T84 nach 24-stündiger Inkubation mit FÜ und analogen SCFA-Gemischen. Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikant unterschiedlichen Vitalitätsraten (n=3-7) mit dem dazugehörigen p-Wert. -- = kein signifikanter Unterschied.

	Konz.	Vitalität (%), p HT29 / HT29 Clon 19A	Vitalität (%), p HT29 / T84	Vitalität (%), p HT29 Clon 19A / T84
FÜ „Kontrolle“	2%	--	--	--
	10%	--	89,8/113,2 p<0,05	--
	50%	--	--	64,1/96,9 p<0,05
SCFA „Kontrolle“	2%	--	--	--
	10%	--	--	--
	50%	--	--	59,4/87,2 p<0,05
FÜ BC-O 165	2%	--	--	88,7/107,4 p<0,05
	10%	--	--	69,3/111,8 p<0,05
	50%	76,4/53,8 p<0,05	--	--
SCFA BC-O 165	2%	--	--	--
	10%	--	--	65,5/105,2 p<0,05
	50%	--	--	58,3/90,7 p<0,05
FÜ BC-O 299	2%	--	--	--
	10%	--	95,5/114,0 p<0,05	--
	50%	--	--	--
SCFA BC-O 299	2%	--	--	--
	10%	--	--	--
	50%	--	--	62,5/87,6 p<0,05
FÜ BC-P 114	2%	--	--	--
	10%	--	--	73,7/105,2 p<0,05
	50%	--	--	--
SCFA BC-P 114	2%	--	--	--
	10%	--	--	73,4/102,2 p<0,05
	50%	--	--	--

4.3 Proliferation

Die Proliferations-Versuche wurden jeweils über 7 Tage durchgeführt. Für die Versuchsauswertung wurden die Ergebnisse nach 5-tägiger Inkubation mit Testsubstanzen herangezogen.

4.3.1 HT29

Alle getesteten FÜ und analogen SCFA-Gemische hemmten dosisabhängig die Proliferation von HT29-Zellen (s. Abb. 14a und b). Signifikante Effekte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Komplettmedium) traten sowohl bei allen FÜ als auch bei den korrespondierenden SCFA-Gemischen bereits in Konzentrationen ab 2 % auf. In der Konzentration 50% war die Wirkung der FÜ bzw. der SCFA-Gemische so stark, dass alle Zellen zugrunde gingen und überhaupt keine Proliferation mehr stattfinden konnte.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen FÜ und ihren analogen SCFA-Gemischen gab es lediglich bei der höchsten Konzentration von 50%. Allerdings sind diese Unterschiede nur im Fall des FÜ/SCFA-Gemischs „Kontrolle“ relevant, wo das 50%ige SCFA-Gemisch im Gegensatz zum FÜ kein komplettes Absterben der Zellen verursachte. Bei den anderen FÜ/SCFA-Gemischen lag in allen Fällen das Wachstum praktisch bei Null, so dass trotz rechnerischen Unterschieds von einem gleich starken Effekt ausgegangen werden kann.

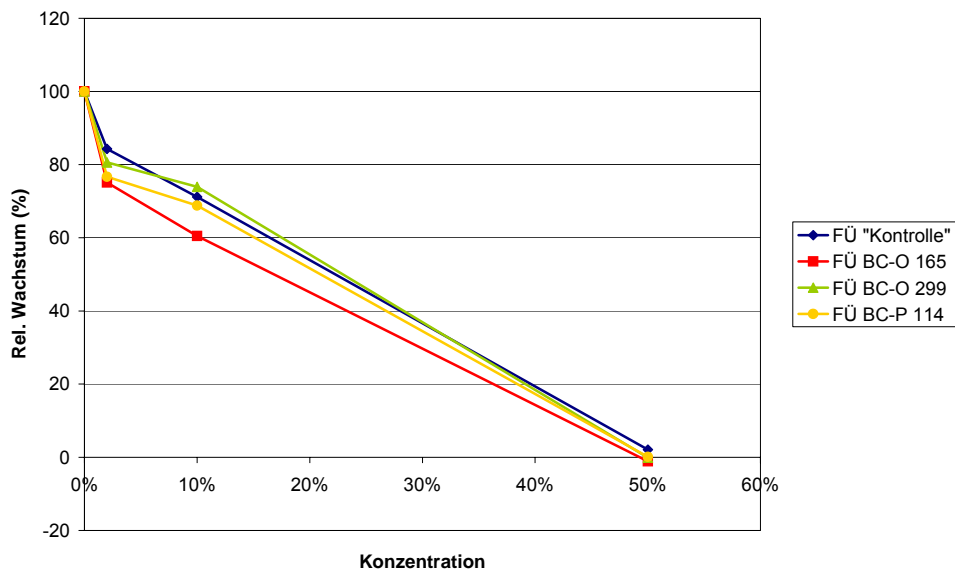


Abb. 14a: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit verschiedenen FÜ (MW, n=4). Die relative Wachstumsrate wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle berechnet (Komplettmedium=100% Wachstum). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen und Signifikanzen verzichtet (s. Tabellenanhang Tab. A2).

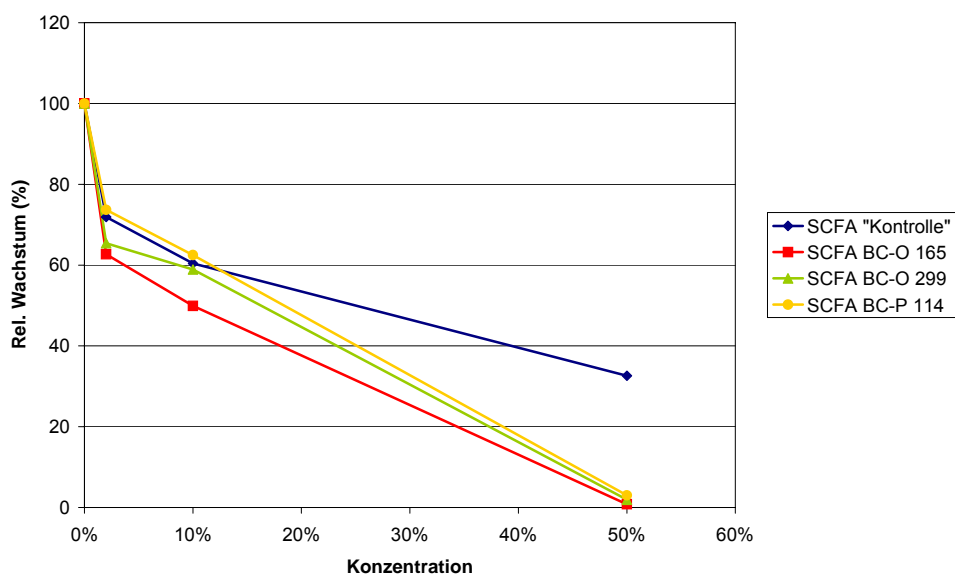


Abb. 14b: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen (MW, n=4). Die relative Wachstumsrate wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle berechnet (Komplettmedium=100% Wachstum). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen und Signifikanzen verzichtet (s. Tabellenanhang Tab. A2).

Zwischen den verschiedenen FÜ bestanden keine signifikanten Wirkungsunterschiede. Bei den SCFA-Gemischen war das Gemisch „Kontrolle“ weniger proliferationshemmend als alle anderen Gemische, signifikant war dieser Effekt im Vergleich mit BC-O 165 in der Konzentration 2%.

4.3.2 HT29 Clon 19A

Auch bei HT29 Clon 19A-Zellen hemmten alle getesteten FÜ und analogen SCFA-Gemische dosisabhängig die Proliferation (s. Abb. 15a und b). Der FÜ BC-P 114 konnte bei dieser Zelllinie leider wegen Substanzmangels nicht untersucht werden.

Beim FÜ „Kontrolle“ lag nur bei der Konzentration von 50% eine signifikante Proliferationshemmung vor. Signifikant unterschieden sich FÜ „Kontrolle“ und SCFA-Gemisch „Kontrolle“ in den Konzentrationen 2 und 10%; in beiden Fällen war das SCFA-Gemisch stärker proliferationshemmend. Auch beim FÜ BC-O 299 trat erst bei einer Konzentration von 50% eine signifikante Proliferationshemmung ein, die analogen SCFA-Gemische waren in allen Konzentrationen signifikant proliferationshemmend. Die Wirkungen von FÜ und SCFA-Gemisch BC-O 299 unterschieden sich bei allen Konzentrationen nicht. Der FÜ BC-O 165 war ab der Konzentration von 10% signifikant proliferationshemmend, das SCFA-Gemisch in allen verwendeten Konzentrationen. Signifikante Unterschiede zwischen FÜ und SCFA-Gemisch BC-O 165 gab es lediglich bei der Konzentration 50 %, wobei dieser Unterschied nicht relevant ist, da das Wachstum der Zellen in beiden Fällen praktisch Null war.

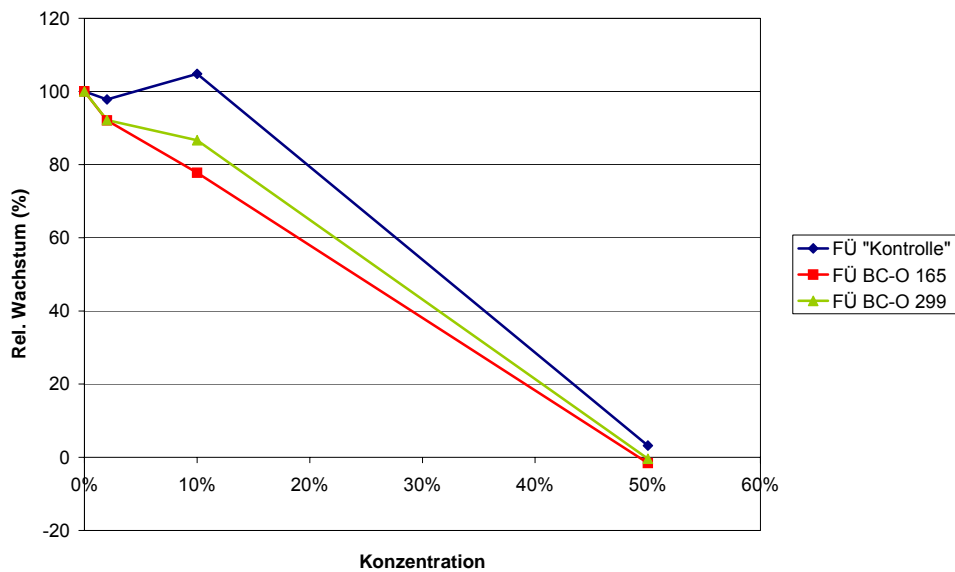


Abb. 15a: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29 Clon 19A-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit verschiedenen FÜ (MW, n=4). Die relative Wachstumsrate wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle berechnet (Komplettmedium=100% Wachstum). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen und Signifikanzen verzichtet (s. Tabellenanhang Tab. A2).

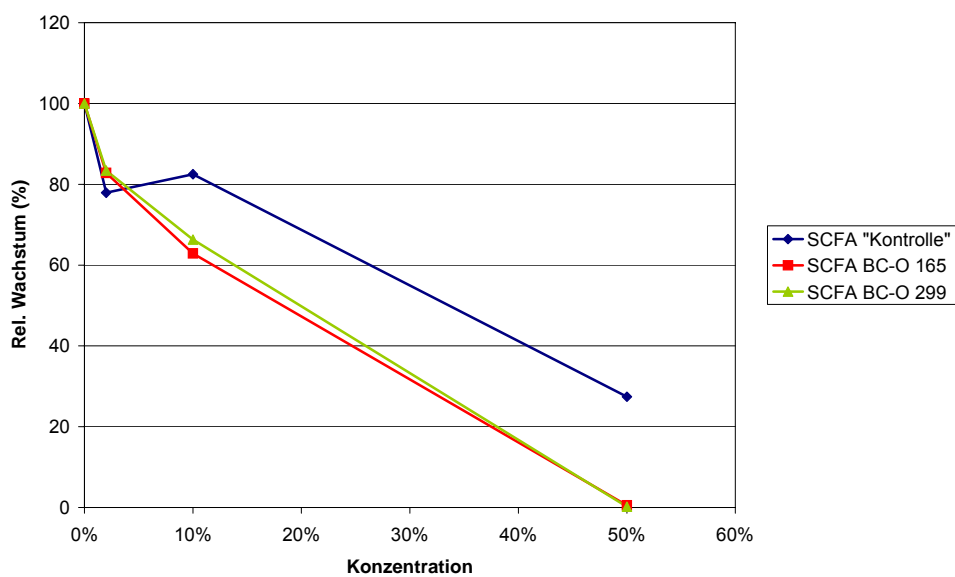


Abb. 15b: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von HT29 Clon 19A-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen (MW, n=4). Die relative Wachstumsrate wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle berechnet (Komplettmedium=100% Wachstum). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen und Signifikanzen verzichtet (s. Tabellenanhang Tab. A2).

Die Unterschiede in der Wirkung zwischen den einzelnen FÜ waren nicht signifikant, nur in der Konzentration 50% unterschieden sich der FÜ „Kontrolle“ und BC-O 165, wobei wiederum in beiden Fällen praktisch kein Wachstum mehr zu verzeichnen war.

Bei den SCFA-Gemischen war das Gemisch „Kontrolle“ am schwächsten proliferationshemmend. Signifikant war die schwächere Wirkung im Vergleich zum Gemisch BC-O 165 in der Konzentration 10% und zu BC-O 299 in der Konzentration 50%.

4.3.3 T84

Auch bei T84-Zellen wurde das Zellwachstum dosisabhängig sowohl durch die FÜ als auch durch die analogen SCFA-Gemische gehemmt (s. Abb. 16a und b). Bei den FÜ war die Proliferationshemmung im Vergleich zu DMEM in allen Konzentrationen signifikant, ebenso bei allen SCFA-Gemischen. Im Vergleich der einzelnen FÜ mit ihren korrespondierenden SCFA-Gemischen zeigte sich bei „Kontrolle“, BC-O 165 und BC-O 299 bei der Konzentration 10% eine höhere Wachstumsrate der Zellen unter der FÜ Behandlung als unter der SCFA-Behandlung. Im Gegensatz dazu war bei allen FÜ in der Konzentration 50% die Wachstumsrate niedriger als unter der Behandlung mit den jeweiligen analogen SCFA-Gemischen in der entsprechenden Konzentration.

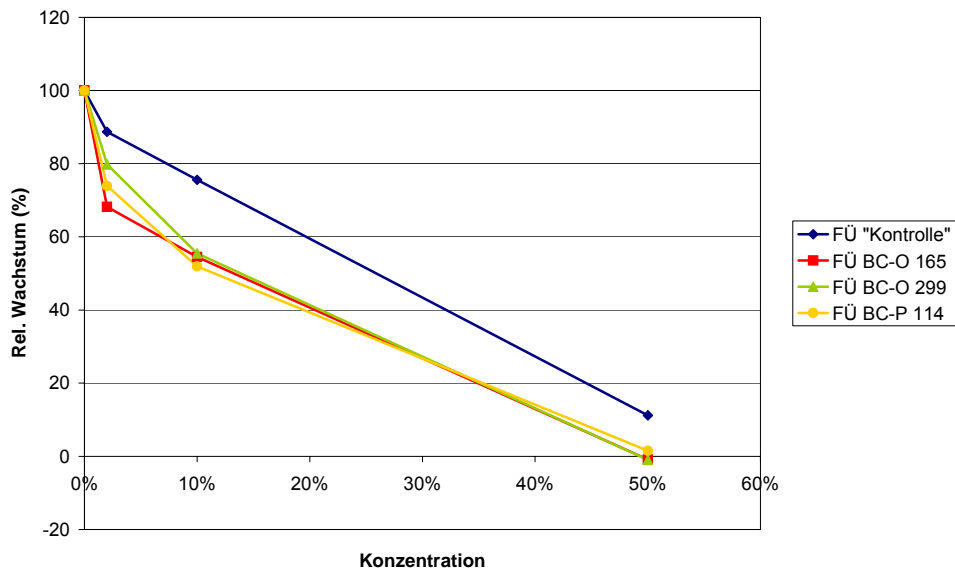


Abb. 16a: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von T84-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit verschiedenen FÜ (MW, n=4). Die relative Wachstumsrate wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle berechnet (Komplettmedium=100% Wachstum). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen und Signifikanzen verzichtet (s. Tabellenanhang Tab. A2).

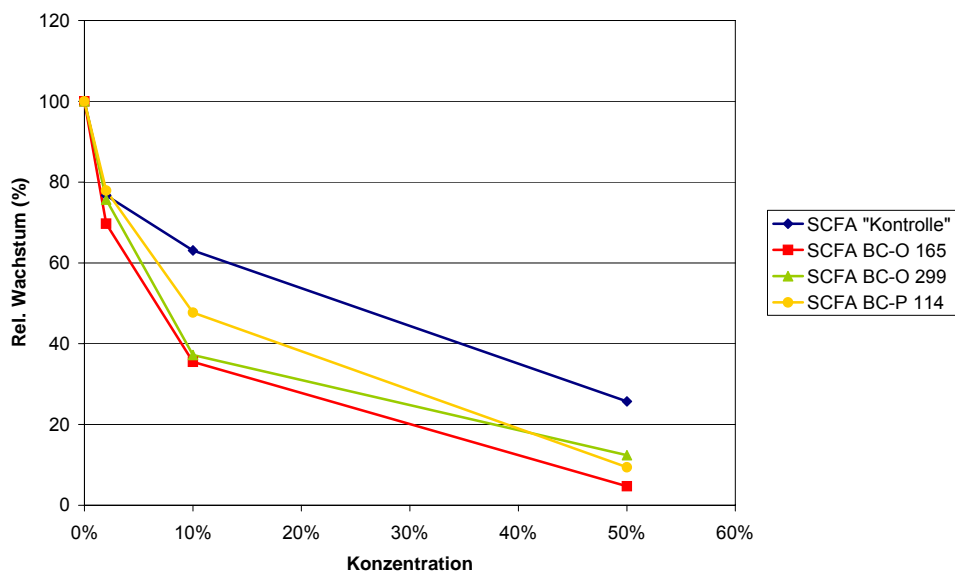


Abb. 16b: Dosisabhängige relative Proliferationshemmung von T84-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen (MW, n=4). Die relative Wachstumsrate wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle berechnet (Komplettmedium=100% Wachstum). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen und Signifikanzen verzichtet (s. Tabellenanhang Tab. A2).

Im Vergleich der FÜ untereinander zeigte sich nach Inkubation mit „Kontrolle“ eine höhere Proliferationsrate als nach Inkubation mit den anderen FÜ. Signifikant waren diese Unterschiede zwischen „Kontrolle“ 2% und BC-O 165 2%, „Kontrolle“ 50% und BC-O 199 50% und „Kontrolle“ 50% und BC-O 165 50%. Auch bei den SCFA-Gemischen wirkte das Gemisch „Kontrolle“ weniger proliferationshemmend in den Konzentrationen 10 und 50% als die anderen Gemische. Signifikant war dieser Effekt zwischen „Kontrolle“ 10% und BC-O 165 10% und zwischen „Kontrolle“ 50% und BC-O 165 50%.

4.3.4 Vergleich der Zelllinien

Unterschiede im Wachstum nach 5-tägiger Inkubation mit FÜ bzw. SCFA-Gemischen zeigten sich hauptsächlich zwischen HT29 Clon 19A- und T84-Zellen (s. Tab. 5). Die Ergebnisse lassen sich jedoch nicht eindeutig dahingehend interpretieren, welche Zelllinie sensitiver auf die Behandlung reagierte.

Tab. 5: Vergleich der Proliferationsraten der Zelllinien HT29, HT29 Clon 19A und T84 nach 5-tägiger Inkubation mit FÜ und analogen SCFA-Gemischen. Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikant unterschiedlichen Vitalitätsraten (n=3-7) mit dem dazugehörigen p-Wert, -- = kein signifikanter Unterschied.

	Konz. [%]	Rel. Wachstum (%), p HT29 / HT29 Clon 19A	Rel Wachstum (%), p HT29 / T84	Rel Wachstum (%), p HT29 Clon 19A / T84
FÜ „Kontrolle“	2	--	--	--
	10	--	--	--
	50	--	--	--
SCFA „Kontrolle“	2	--	--	--
	10	--	--	--
	50	--	--	--
FÜ BC-O 165	2	--	--	92,1/68,2 p<0,05
	10	--	--	77,8/54,5 p<0,05
	50	--	--	--
SCFA BC-O 165	2	--	--	--
	10	--	--	62,9/35,5 p<0,05
	50	--	--	--
FÜ BC-O 299	2	--	--	--
	10	--	--	87,6/55,5 p<0,05
	50	--	--	--
SCFA BC-O 299	2	--	--	--
	10	--	--	66,3/37,2 p<0,05
	50	--	--	0,2/12,4 p<0,05
FÜ BC-P 114	2	*	--	*
	10	*	--	*
	50	*	--	*
SCFA BC-P 114	2	*	--	*
	10	*	62,5/47,7 p=0,057	*
	50	*	3,0/9,4 p=0,057	*

* Kein Vergleich möglich, da wegen Substanzmangels BC-P 114 bei HT29 Clon 19A-Zellen nicht getestet werden konnte.

4.4 Apoptose

In Vorversuchen wurde bei HT29-Zellen sowohl im Annexin V- als auch im Caspase-3-Test nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erst ab einer 50%igen Konzentration der FÜ und SCFA-Gemische eine signifikante Apoptoseinduktion erreicht. Daher sind im Folgenden nur Ergebnisse mit der Konzentration 50% dargestellt. Die Positiv-Kontrolle mit 0,5 μM Staurosporin + 0,5 μM Brefeldin A bewirkte bei allen Zelllinien eine signifikante Apoptose-Induktion im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Zellkultur-medium ohne Zusätze).

Im Allgemeinen wurden bei gleicher Behandlung im Caspase-3-Test etwas geringere Apoptoseraten gemessen als im Annexin V-Test. Die Ursache hierfür könnte im unterschiedlichen Testprinzip der beiden Parameter liegen: Beim Annexin V-Test bindet FITC-markiertes Annexin V an PS auf der Zelloberfläche. Die aktivierte Caspase-3 wird intrazellulär gemessen, wozu eine Permeabilisierung der Zellen notwendig ist. Abb. 17 zeigt Beispiele von Durchflusscytometer-Messungen nach Annexin V-FITC/PI-Färbung.

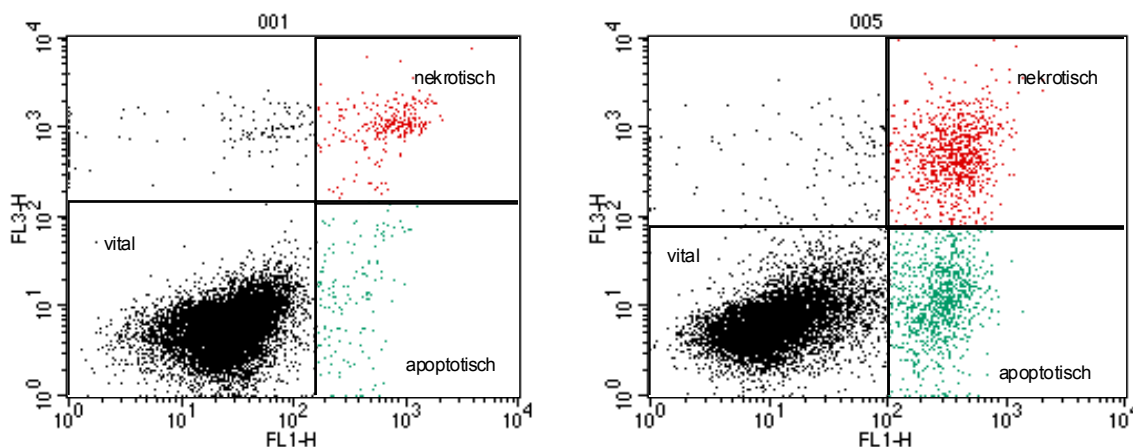


Abb. 17: Annexin V/PI-gefärbte HT29-Zellen im Dot-Plot (x-Achse: FITC, y-Achse: PI). Der linke Dot-Plot zeigt die unbehandelte Negativ-Kontrolle (DMEM), der rechte Dot-Plot zeigt die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit dem Fermentationsüberstand BC-P 114. Der FÜ bewirkt eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen im rechten unteren Quadranten; auch die Anzahl nekrotischer Zellen nimmt zu.

4.4.1 HT29

Alle getesteten FÜ und SCFA-Gemische induzierten in der Konzentration 50% nach 24-stündiger Inkubationszeit signifikant Apoptose bei HT29-Zellen. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse aus dem Annexin V-Test. Durch die Bestimmung des Anteils der Zellen mit aktivierter Caspase-3 konnten die Ergebnisse aus dem Annexin V-Test bestätigt werden (s. Tab. 6).

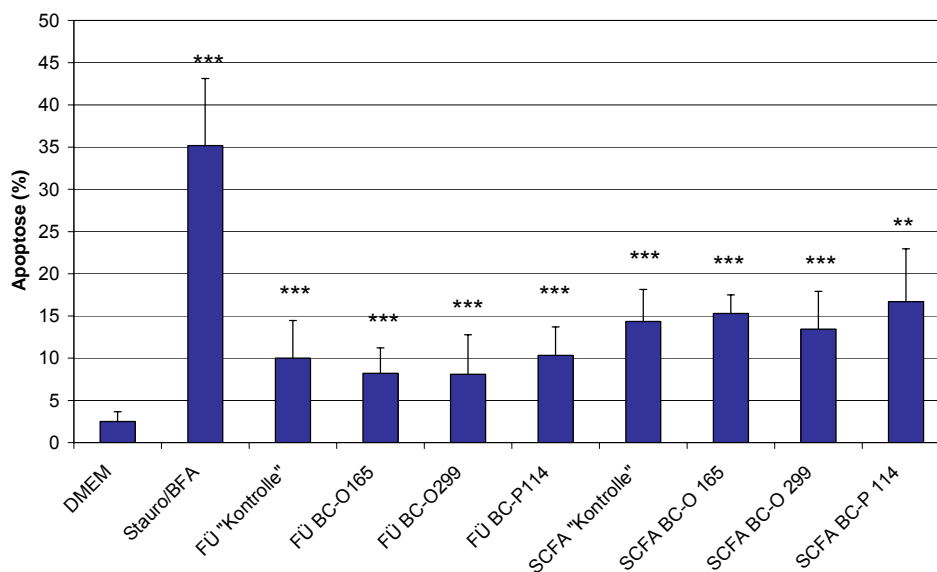


Abb. 18: Apoptoserate bei HT29-Zellen im Annexin V-Test in % der gesamten Zellen nach Inkubation (24 h) mit verschiedenen FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %. Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) dargestellt (MW+SD, n= 4-14).

Nach Inkubation mit den SCFA-Gemischen zeigen die Zellen höhere Apoptoseraten als nach Inkubation mit den entsprechenden FÜ, signifikant sind diese Unterschiede zwischen FÜ „Kontrolle“/SCFA „Kontrolle“, FÜ BC-O 165/SCFA BC-O 165 und FÜ BC-O 299/SCFA BC-O 299.

Die FÜ untereinander unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Wirkung, ebenso die SCFA-Gemische.

4.4.2 HT29 Clon 19A

Bei HT29 Clon 19A-Zellen konnten durch Zugabe der FÜ und SCFA-Gemische im Vergleich zu HT29-Zellen nur geringere Apoptoseraten erzielt werden. Signifikant apoptoseinduzierend im Vergleich zu DMEM wirkten im Annexin V-Test nur die FÜ

„Kontrolle“ und das korrespondierende SCFA-Gemisch und die SCFA-Gemische BC-O 165 und BC-P 114. Insgesamt zeigten die SCFA-Gemische wieder eine stärker apoptoseinduzierende Wirkung als die entsprechenden FÜ, signifikant war dieser Effekt allerdings nur für FÜ BC-P 114/SCFA BC-P 114. Auch das als Positiv-Kontrolle eingesetzte Gemisch aus Staurosporin und Brefeldin A zeigte eine schwächere Wirkung als bei HT29-Zellen (s. Abb. 19). Überraschend war, dass der FÜ „Kontrolle“ und das analoge SCFA-Gemisch „Kontrolle“ die stärkste Apoptoseinduktion bewirkten, obwohl deren SCFA-Konzentration am niedrigsten war.

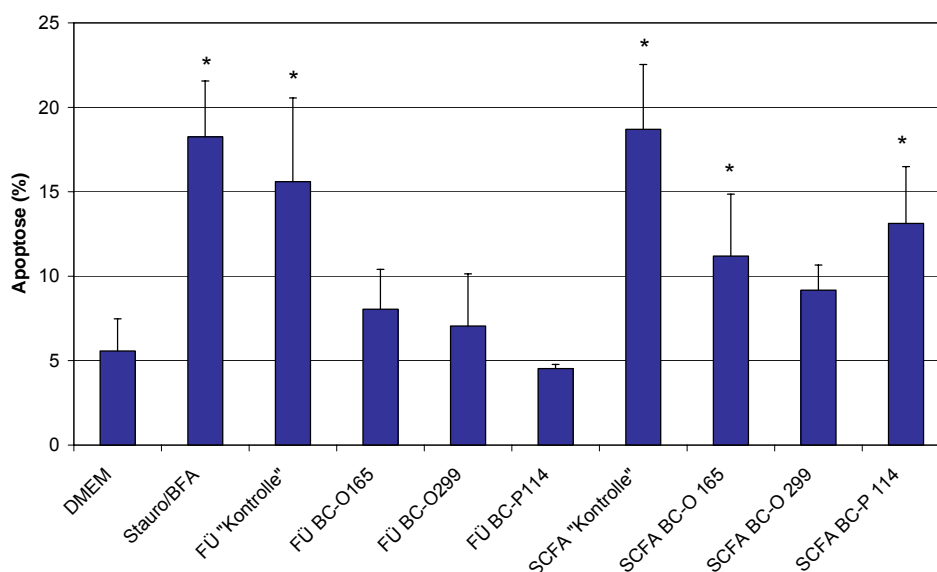


Abb. 19: Apoptoserate bei HT29 Clon 19A-Zellen im Annexin V-Test in % der gesamten Zellen nach Inkubation (24 h) mit verschiedenen FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen. Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) dargestellt (MW+SD, n= 3-4).

Im Caspase-3-Test wurden bei den FÜ „Kontrolle“ und BC-P 114 sowie bei allen SCFA-Gemischen signifikant erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) gemessen (s. Tab. 6). Die Apoptoserate der Positiv-Kontrolle (Staurosporin/BFA je 0,5 µM) war, wie auch im Annexin V-Test, mit 16 % (MW) niedriger als bei HT29-Zellen.

4.4.3 T84

Auch bei T84-Zellen induzierten alle getesteten FÜ und SCFA-Gemische im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) erhöhte Apoptoseraten (s. Abb. 20). Für den FÜ „Kon-

trolle“ und das SCFA-Gemisch BC-P 114 waren die Ergebnisse nicht signifikant, was in der relativ hohen Abweichung zwischen den Einzelversuchen begründet ist.

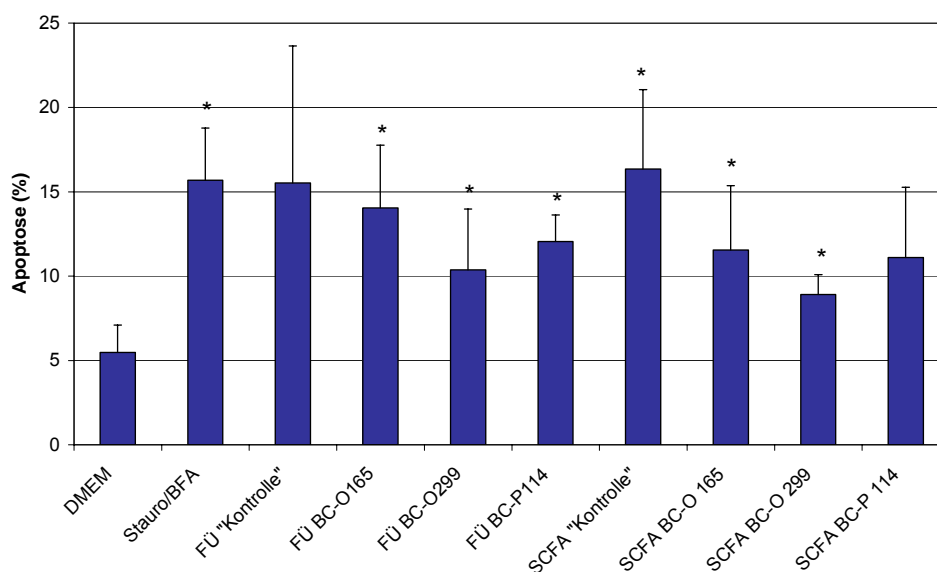


Abb. 20: Apoptoserate bei T84-Zellen im Annexin V-Test in % der gesamten Zellen nach Inkubation (24 h) mit verschiedenen FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen. Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) dargestellt (MW+SD, n= 4).

Im Caspase-3-Test wurden lediglich für die Positiv-Kontrolle (Staurosporin/Brefeldin A je 0,5 μM) und die FÜ BC-O 165 und BC-O 299 signifikant erhöhte Apoptoseraten gemessen (s.Tab. 6).

4.4.4 Vergleich der Zelllinien

4.4.4.1 Negativ- und Positiv-Kontrolle

HT29-Zellen zeigten in der Negativ-Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Zusätze) geringere Apoptoseraten als HT29 Clon 19A- und T84-Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5 μM Staurosporin + 0,5 μM Brefeldin A zeigte sich jedoch eine hohe Sensitivität gegenüber den beiden als Positiv-Kontrolle dienenden Apoptoseinduktoren. Die Apoptoserate im Annexin V- und Caspase 3-Test war bei HT29-Zellen zum Teil mehr als doppelt so hoch wie bei den beiden anderen Zelllinien (s. Tab. 6).

4.4.4.2 FÜ / SCFA-Gemisch „Kontrolle“

Im Annexin V-Test unterschieden sich die Wirkungen des FÜ bzw. des SCFA-Gemischs „Kontrolle“ nicht signifikant bei den einzelnen Zelllinien. Im Caspase-3-Test konnte jedoch bei HT29 Clon 19A-Zellen durch den FÜ eine signifikant höhere Apoptoserate erzielt werden als bei HT29-Zellen (s. Tab. 6).

4.4.4.3 FÜ / SCFA-Gemisch BC-O 165

Mit dem FÜ BC-O 165 konnten bei T84-Zellen im Annexin V-Test die höchsten Apoptoseraten erzielt werden. Die Unterschiede zu HT29- und HT29 Clon 19A-Zellen waren jedoch nicht signifikant. Im Caspase-3-Test waren die Unterschiede zwischen den Zelllinien ebenfalls nicht signifikant (s. Tab. 6).

4.4.4.4 FÜ / SCFA-Gemisch BC-O 299

Die Unterschiede in den Apoptoseraten zwischen den Zelllinien HT29, HT29 Clon 19A und T84 waren nach Behandlung mit dem FÜ bzw. dem analogen SCFA-Gemisch BC-O 299 nicht signifikant (s. Tab. 6).

4.4.4.5 FÜ / SCFA-Gemisch BC-P 114

Der FÜ BC-P 114 induzierte im Annexin V-Test bei T84-Zellen signifikant mehr Apoptose als bei HT29 Clon 19A-Zellen. Dieser Unterschied bestand auch im Caspase-3-Test, war jedoch nicht signifikant. Das SCFA-Gemisch BC-P 114 bewirkte keine signifikant unterschiedlichen Apoptoseraten bei den verschiedenen Zelllinien (s. Tab. 6).

Tab. 6: Apoptoseraten (% der gemessenen Zellen) der verschiedenen Zelllinien nach Messung im Annexin V-Test und nach Messung der aktivierten Caspase-3 (MW±SD, n=3-14). Signifikanzen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle sind im Tabellenanhang (Tab. A3 und A4) verzeichnet.

	HT29		HT29 Clon 19A		T84	
	Annexin	Caspase-3	Annexin	Caspase-3	Annexin	Caspase-3
DMEM	2,5 ± 1,1	1,4 ± 0,6	5,6 ± 1,9	2,2 ± 0,8	5,5 ± 1,6	2,9 ± 0,9
Stauro / BFA	35,2 ± 7,9	32,1 ± 7,2	18,3 ± 3,3	12,8 ± 3,8	15,7 ± 3,1	13,5 ± 4,2
FÜ „Kontrolle“	10,0 ± 4,5	4,8 ± 1,9	15,6 ± 5	15,0 ± 4,5	15,5 ± 8,1	9,5 ± 4,2
SCFA „Kontrolle“	14,4 ± 3,8	16,6 ± 8,3	18,7 ± 3,8	19,2 ± 6,2	16,4 ± 4,7	8,4 ± 3,9
FÜ BC-O 165	8,2 ± 3,0	8,6 ± 6,3	8,1 ± 2,4	4,5 ± 2,8	14,1 ± 3,7	6,8 ± 2,1
SCFA BC-O 165	15,3 ± 2,2	21,6 ± 5,8	11,2 ± 3,7	10,2 ± 2,6	11,6 ± 3,8	9,2 ± 4,4
FÜ BC-O 299	8,1 ± 4,7	5,5 ± 1,8	7,1 ± 3,1	4,9 ± 2,9	10,4 ± 3,6	5,9 ± 2,9
SCFA BC-O 299	13,4 ± 4,5	20,9 ± 9,9	9,2 ± 1,5	9,5 ± 1,5	8,9 ± 1,2	9,3 ± 4,2
FÜ BC-P 114	10,3 ± 3,4	8,8 ± 1,6	4,5 ± 0,3	4,7 ± 2,6	12,1 ± 1,6	7,9 ± 1,4
SCFA BC-P 114	16,7 ± 6,2	15,5 ± 4,5	13,1 ± 3,4	10,3 ± 3,1	11,1 ± 4,2	6,3 ± 3,8

4.5 Zellzyklus

Die Inkubation mit FÜ bzw. analogen SCFA-Gemischen veränderte die Anteile der Zellen in einzelnen Zellzyklusphasen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Zusätze) je nach Zelllinie unterschiedlich. Im Durchflusscytometer wurden die prozentualen Anteile der Zellen in der G0/G1-Phase, der S-Phase und der G2/M-Phase gemessen.

4.5.1 HT29

Die Anteile der Zellen in der G0/G1-Phase blieben bei HT29-Zellen sowohl durch Staurosporin/Brefeldin A als auch durch die FÜ und SCFA-Gemische im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Zusätze) unbeeinflusst. Die S-Phase war im Vergleich zur Negativ-Kontrolle bei allen Ansätzen tendenziell vermindert, signifikant war dieser Effekt beim FÜ „Kontrolle“ sowie bei allen SCFA-Gemischen. Ein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den einzelnen FÜ und SCFA-Gemischen konnte nicht festgestellt werden. Alle SCFA-Gemische verminderten den Anteil der Zellen in der S-Phase stärker als die entsprechenden FÜ, bei FÜ BC-P 114/SCFA BC-P 114 allerdings nur in der Tendenz mit $p=0,057$. Alle FÜ führten bei HT29-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zu einem signifikanten G2-Arrest, die korrespondierenden SCFA-Gemische nicht (s. Abb. 21).

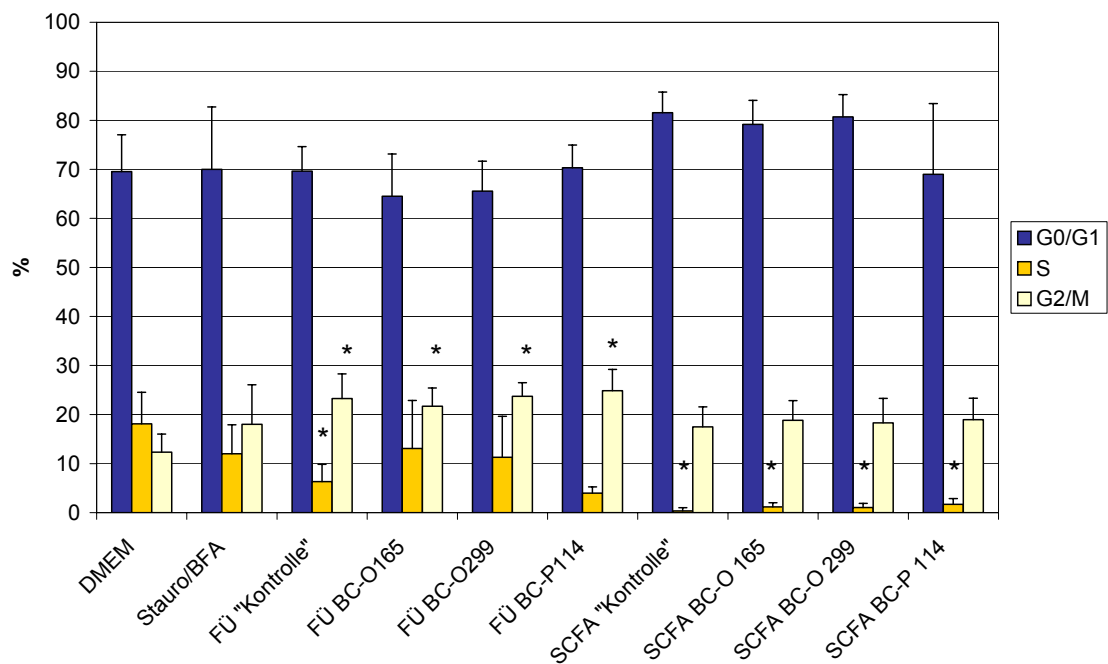


Abb. 21: Prozentuale Anteile von HT29-Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen (MW+SD, n=4). Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) dargestellt.

FÜ und SCFA-Gemische scheinen bei HT29-Zellen den Zellzyklus in unterschiedlichen Phasen zu beeinflussen: die FÜ führten einheitlich zu einem G2-Arrest, während die SCFA-Gemische sich auf die DNA-Synthesephase auswirkten.

4.5.2 HT29 Clon 19A

Bei HT29 Clon 19A-Zellen führten alle getesteten FÜ und korrespondierenden SCFA-Gemische im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Testsubstanzen) zu einem signifikanten G1-Arrest. Die S-Phase war bei allen FÜ und SCFA-Gemischen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle erniedrigt, bei den FÜ BC-O 299 und BC-P 114 allerdings nicht signifikant. Die Wirkung der FÜ bzw. SCFA-Gemische auf die G2/M-Phase war uneinheitlich: Der FÜ BC-P 114 führte zu einer signifikanten Reduzierung des Zellanteils in dieser Zellzyklusphase, das SCFA-Gemische BC-O 165 zu einem signifikanten G2-Arrest. Die übrigen FÜ und SCFA-Gemische zeigten keine signifikanten Effekte (s. Abb. 22).

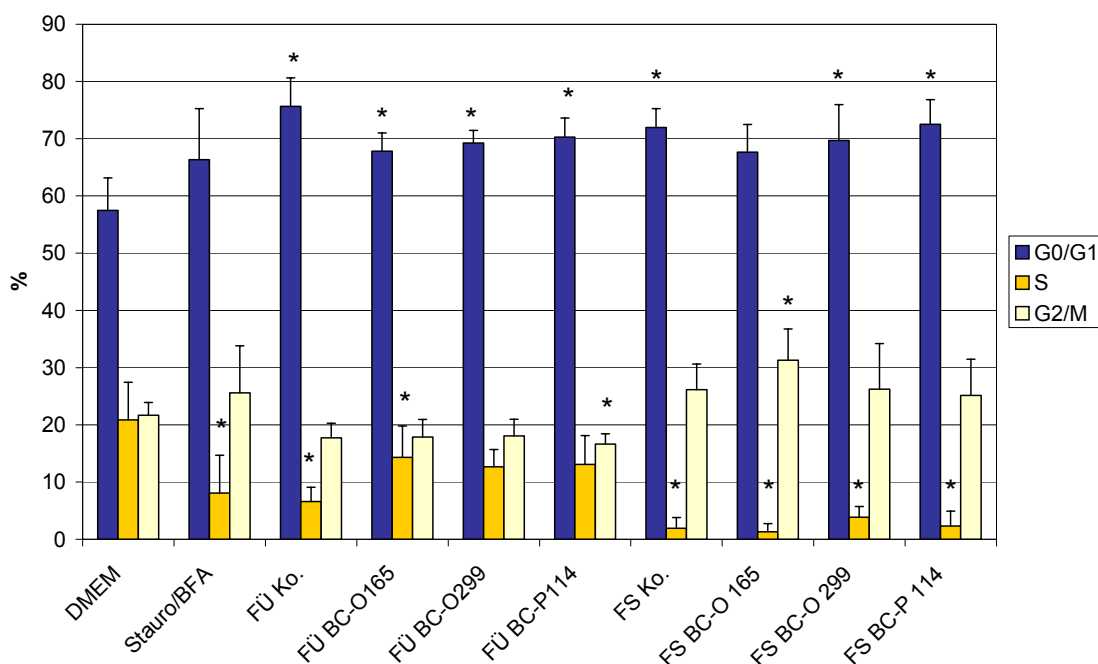


Abb. 22: Prozentuale Anteile von HT29 Clon 19A-Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen (MW+SD, n=3-5). Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) dargestellt.

In ihrer Wirkung auf die G0/G1-Phase unterschieden sich die FÜ nicht von ihren korrespondierenden SCFA-Gemischen. Die S-Phase wurde tendenziell mehr durch die SCFA-Gemische als durch die entsprechenden FÜ reduziert, signifikant war dieser Unterschied zwischen FÜ und SCFA-Gemisch BC-O 165 und BC-O 299. Der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase war nach Inkubation mit dem SCFA-Gemisch BC-O 165 signifikant höher als nach Inkubation mit dem FÜ BC-O 165. Ansonsten gab es in der Wirkung auf die G2/M-Phase keine signifikanten Unterschieden zwischen den FÜ und ihren entsprechenden SCFA-Gemischen.

4.5.3 T84

Bei T84-Zellen führte nur der FÜ BC-O 165, aber alle SCFA-Gemische zu einem im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikant erhöhten Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase. Die S-Phase war bei allen Testsubstanzen signifikant erniedrigt, die G2/M-Phase erhöht (s. Abb. 23).

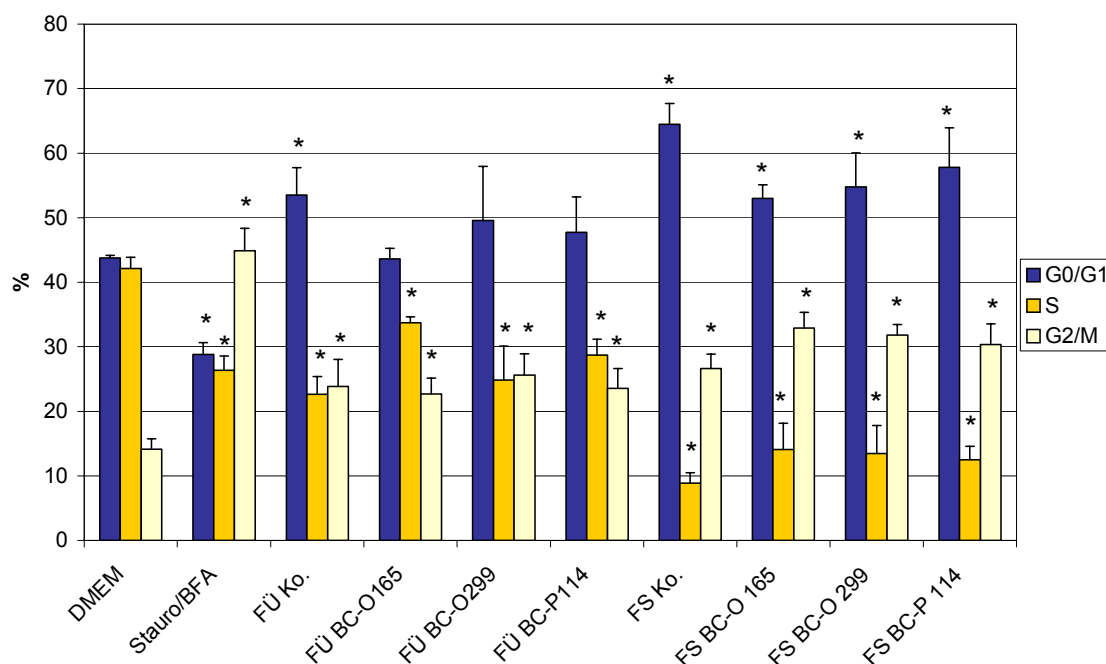


Abb. 23: Prozentuale Anteile von T84-Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M nach Inkubation mit verschiedenen FÜ und analogen SCFA-Gemischen (MW+SD, n=3). Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMEM) dargestellt.

Sowohl zwischen den FÜ als auch zwischen den SCFA-Gemischen untereinander gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen bei T84-Zellen. Die FÜ und ihre korrespondierenden SCFA-Gemische unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die G0/G1-Phase nicht voneinander. Die SCFA-Gemische induzieren jedoch im Vergleich zu ihren entsprechenden FÜ eine signifikant stärkere Reduktion der Zellanteile in der S-Phase. Die SCFA-Gemische führen auch zu einem stärkeren G2-Arrest als die FÜ (nicht signifikant bei FÜ/SCFA „Kontrolle“).

4.6 Ussing-Kammern

Werden die Testsubstanzen in der höchsten verwendeten Konzentration von 50 % auf die luminale Seite des Monolayers gegeben und transepithelialer Widerstand bzw. Kurzschlussstrom in Ussing-Kammern gemessen, gibt es sowohl durch die FÜ (s. Abb. 24) als auch durch die analogen SCFA-Gemische (Abb. 25) keine bzw. minimale Effekte im Vergleich zur Basislinie. Versuche mit SCFA als Einzelsubstanzen (Na-Acetat, Na-Propionat, Na-Butyrat, jeweils 150 mM) zeigten ebenfalls keine Veränderungen des Kurzschlussstroms (Daten nicht gezeigt).

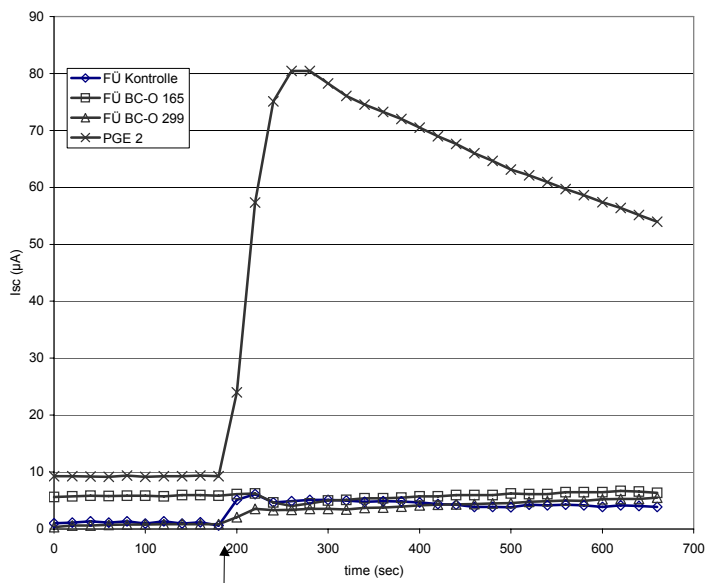


Abb. 24: Messung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) in Ussing-Kammern bei HT29 Clon 19A-Zellen nach Perfusion mit verschiedenen FÜ und Prostaglandin E_2 (PGE_2) als Positiv-Kontrolle. Darstellung eines repräsentativen Experiments. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

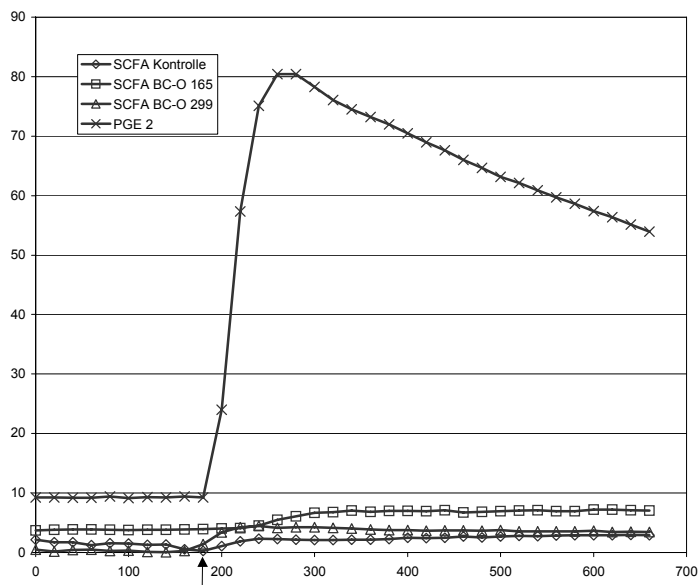


Abb. 25: Messung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) in Ussing-Kammern bei HT29 Clon 19A-Zellen nach Perfusion mit analogen SCFA-Gemischen und Prostaglandin E_2 (PGE_2) als Positiv-Kontrolle. Darstellung eines repräsentativen Experiments. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

5 Diskussion

5.1 *In vitro*-Fermentation von Oligosacchariden mit Humanfaeces

Die physiologischen Eigenschaften präbiotischer Kohlenhydrate werden weitgehend durch ihre Fermentierbarkeit im Dickdarm bestimmt. Die Fermentation der für diese Arbeit verwendeten neu entwickelten Kohlenhydrate mit Humanfaeces führte zu einem deutlichen Anstieg der SCFA-Konzentrationen in den Fermentationsüberständen im Vergleich zur Fermentationskontrolle, die ohne Zusatz von OS hergestellt wurde. Die für die Fermentation eingesetzten OS unterschieden sich in ihrem Fermentationsmuster, zum Teil allerdings nur wenig. Das SCFA-Verhältnis in den FÜ war für alle eingesetzten OS ähnlich: Im FÜ BC-O 165 lagen Acetat:Propionat:Butyrat im prozentualen molaren Verhältnis (gerundet) 52:25:23 vor, im FÜ BC-O 299 60:23:18, im FÜ BC-P 114 53:25:22. Der FÜ „Kontrolle“, der ohne OS-Zusatz hergestellt wurde, wies dagegen das SCFA-Verhältnis 68:15:16 auf. Das Verhältnis der drei Haupt-Fettsäuren in den FÜ nach OS-Fermentation entsprach damit weitgehend den *in vivo*-Verhältnissen [Cummings *et al.*, 1987]. Durch die Fermentation der OS konnte zwar eine Verschiebung des Verhältnisses von Acetat:Propionat:Butyrat zugunsten von Butyrat im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden, nicht aber im Vergleich zu den vorliegenden *in vivo*-Daten. Die absoluten SCFA-Konzentrationen der FÜ nach OS-Fermentation waren niedriger bzw. im unteren Bereich dessen, was bisher in Faeces oder in Faeceswasser gemessen wurde [Vernia *et al.*, 1984; Cummings *et al.*, 1987; Dolara *et al.*, 2002]. Diese niedrigeren Konzentrationen sind durch die für den *in vitro*-Fermentationsprozess vorgenommene Verdünnung der Faecesproben mit Medium bedingt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass in der Zeit zwischen Probengewinnung und Start der *in vitro*-Fermentation, trotz bestmöglicher Einhaltung anaerober Verhältnisse, ein Teil der fermentierenden Bakterien durch Kontakt mit Luftsauerstoff zugrunde ging. Die vorliegenden Ergebnisse der Fermentationen weisen aber darauf hin, dass die verwendeten Kohlenhydrate auch bei einer *in vivo*-Studie durch Colonbakterien fermentiert werden und zu einer Erhöhung der SCFA-Konzentrationen im Dickdarm führen können. Die SCFA-Konzentrationen aus verschiedenen Fermentationschargen waren reproduzierbar,

obwohl die Testpersonen vor der jeweiligen Probennahme keine kontrollierte Diät einhalten mussten, und so Schwankungen in der Ballaststoffzufuhr, z.B. durch saisonal unterschiedlichen Obst- und Gemüseverzehr, gegeben sind. Dies bestätigt die konstante Zusammensetzung der Colonflora unter physiologischen Bedingungen, die bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte [Zoetendal *et al.*, 1998; Lu & Walker, 2001]. Für zukünftige Studien sollte trotzdem mindestens zwei Wochen vor der geplanten Probennahme eine kontrollierte Diät eingehalten werden, um die Schwankungen zwischen verschiedenen Fermentationschargen zu minimieren.

Ob eine Verschiebung der SCFA-Verhältnisse zugunsten von Butyrat *in vivo* erreicht werden kann, ist erst in einer Interventionsstudie abschließend zu beurteilen.

5.2 Etablierung eines Methodenpanels für das *In vitro*-Screening neu entwickelter präbiotisch wirksamer Oligosaccharide

Da eine größere Anzahl neu entwickelter funktioneller Kohlenhydrate untersucht werden sollte, musste ein Methodenpanel entwickelt werden, das wichtige Parameter der Colonicarcinogenese *in vitro* erfasst und für Screening-Untersuchungen geeignet ist. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Wirken die Testsubstanzen cytotoxisch auf konfluente Colonicarcinom-Zelllinien?
- Welchen Einfluss haben die Testsubstanzen auf Colonicarcinom-Zelllinien in der exponentiellen Wachstumsphase und wie beeinflussen sie die Zellproliferation bei längerer Inkubationszeit?
- Induzieren die Testsubstanzen Apoptose?
- Beeinflussen die Testsubstanzen den Zellzyklus?
- Gibt es Effekte auf ausdifferenzierte Colonicarcinom-Zelllinien HT29 Clon 19A und T84 in Ussing-Kammern, messbar als Veränderung elektrischer Parameter?
- Sind gemessene Effekte auf die in den FÜ enthaltenen SCFA zurückzuführen?
- Sind diese Effekte abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelllinien?

Mit Hilfe des angewandten Methodenspektrums konnten substanzspezifische Ergebnisse in allen Wachstumsphasen von Colocarzinom-Zelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade verzeichnet werden: exponentielles Wachstum, subkonfluente und konfluente Zellen und ausdifferenzierte Zell-Monolayer. Leider unterschieden sich die ausgewählten FÜ und ihre analogen SCFA-Gemische nicht genügend in ihrer Zusammensetzung, um größere Wirkungsdifferenzen herausarbeiten und letztendlich aus den *in vitro*-Daten heraus schließen zu können, welche Oligosaccharide für künftige *in vivo*-Studien ausgewählt werden sollen. Durch die parallele Untersuchung analoger SCFA-Gemische in PBS konnte allerdings gezeigt werden, dass cytotoxische und proliferationshemmende Effekte der FÜ im Wesentlichen auf ihren SCFA-Gehalt zurückzuführen sind. Für Apoptoseinduktion und Zellzyklus konnte dies nicht bestätigt werden (s. Diskussion der Einzelergebnisse). Für künftige Studien sollten Fermentationsüberstände ausgewählt werden, die größere Unterschiede in ihrer SCFA-Zusammensetzung zeigen.

5.3 Cytotoxizität der Fermentationsüberstände und SCFA-Gemische

Cytotoxische und proliferationshemmende Effekte von Substanzen sind abhängig von der Zelldichte bzw. der Zellzyklusphase, in der sich kultivierte Zellen zum Zeitpunkt der Exposition befinden. Die Cytotoxizität der FÜ bzw. der korrespondierenden SCFA-Gemische wurde an konfluenten Zellen untersucht. In diesem Stadium zeigen kultivierte Zellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber potentiell toxischen Substanzen als in der exponentiellen Wachstumsphase, wie sie etwa beim Proliferationstest vorliegt. In der niedrigsten verwendeten Konzentration von 2 % zeigten bei allen Zelllinien weder FÜ noch SCFA-Gemische signifikante cytotoxische Effekte. In der höchsten verwendeten Konzentration von 50% waren die meisten FÜ und SCFA-Gemische cytotoxisch. Eine Ausnahme war der FÜ „Kontrolle“, der nur bei HT29 Clon 19A eine cytotoxische Wirkung zeigte. Der FÜ und das SCFA-Gemisch „Kontrolle“ enthalten zwar die geringsten SCFA-Konzentrationen, leider waren aber die Korrelationen zwischen SCFA-Konzentrationen und cytotoxischer Wirkung, sowohl bei den Einzel-Fettsäuren als auch bei den Gesamt-Fettsäuren (Acetat + Propionat + Butyrat), nicht signifikant.

Obwohl keine signifikanten Korrelationen hinsichtlich SCFA-Konzentrationen und cytotoxischer Wirkung erzielt werden konnten, sind die gemessenen cytotoxischen Effekte der FÜ hauptsächlich auf die darin enthaltenen SCFA zurückzuführen, da die korres-

pondierenden SCFA-Gemische, die parallel untersucht wurden, ähnliche dosisabhängige Effekte erzielten. Die Unterschiede in den SCFA-Konzentrationen zwischen den einzelnen FÜ waren aber vermutlich zu gering, um eine Aussage treffen zu können, ob ein bestimmtes Ausgangs-Oligosaccharid bei der Fermentation ein SCFA-Muster erzeugt, das Colonicarcinomzellen mehr schädigen kann als ein anderes.

Der FÜ „Kontrolle“ mit der niedrigsten SCFA-Konzentration war nur bei HT29 Clon 19A-Zellen wirksam. Diese Zelllinie reagierte allgemein am empfindlichsten auf die Behandlung mit den FÜ bzw. SCFA-Gemischen, signifikant waren diese Unterschiede vor allem im Vergleich mit T84-Zellen.

Eigene Untersuchungen mit Faeceswasser (FW) zeigten, dass FW bereits ab Konzentrationen von ca. 7 % signifikante cytotoxische Effekte bei HT29-Zellen hat (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede in der Wirkung im Vergleich mit den FÜ sind wahrscheinlich zumindest zum Teil durch die Verdünnung des Faeces mit Medium zu erklären, was für den Fermentationsprozess notwendig war.

5.4 Proliferation

Alle verwendeten FÜ und SCFA-Gemische verminderten dosisabhängig das Wachstum der Colonicarcinomzellen, zum Teil bereits schon in der niedrigsten verwendeten Konzentration von 2 %. Die höchsten Konzentrationen von 50 % führten zu einem kompletten Absterben der Zellen, was die Ergebnisse der Cytotoxizitätsversuche bestätigte.

In einer Studie mit isolierten Colonicrypten aus Biopsien von Patienten mit sporadischen Colonicpolypen wurde keine Korrelation der Konzentrationen einzelner SCFA aus gleichzeitig entnommenen Stuhlproben mit der Proliferationsrate der Colonicepithelzellen aus Colonicbiopsien festgestellt. Allerdings war die Gesamt-SCFA-Konzentration der Stuhlproben signifikant negativ mit der Zellproliferation korreliert, d.h., je höher die Gesamt-SCFA-Konzentration, desto niedriger war die Proliferationsrate. Die SCFA-Konzentrationen im Stuhl der Patienten lagen im Mittel bei 68,6 mol/kg, also etwas über den Konzentrationen, die in den FÜ bei der vorliegenden Arbeit erreicht wurden [Dolara *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnten bei der Zellproliferation wie auch beim Cytotoxizitätstest keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Grad der Proliferationshemmung und den SCFA-Konzentrationen erzielt werden. Auch hier sind

vermutlich die Unterschiede in den SCFA-Konzentrationen der einzelnen FÜ bzw. SCFA-Gemische zu gering, um signifikant unterschiedliche Ergebnisse zu erzielen.

Auffallend war beim FÜ/SCFA-Gemisch „Kontrolle“, dass bei allen Zelllinien der FÜ in der Konzentration 50 % die Zellproliferation signifikant stärker hemmte als das korrespondierende SCFA-Gemisch. Ansonsten unterschieden sich FÜ und SCFA-Gemische bei HT29 und HT29 Clon 19A-Zellen nicht signifikant in ihrer Wirkung. Bei T84-Zellen konnten zwischen allen verwendeten FÜ und analogen SCFA-Gemischen signifikante Unterschiede festgestellt werden, es zeigte sich jedoch kein einheitliches Verhalten. So wirkten der FÜ BC-O 165 und BC-O 299 in der Konzentration 10 % stärker proliferationshemmend als die entsprechenden SCFA-Gemische, der FÜ BC-P 114 hemmte aber 50 %ig die Proliferation signifikant stärker als das SCFA-Gemisch BC-P 114 50%. Zwischen den einzelnen Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum nach Behandlung mit FÜ bzw. SCFA-Gemischen festgestellt werden.

Die proliferationshemmenden Eigenschaften der FÜ sind weitgehend auf die darin enthaltenen SCFA zurückzuführen. Warum der FÜ „Kontrolle“ bei allen Zelllinien signifikant stärker proliferationshemmend wirkte als das analoge SCFA-Gemisch, und warum bei T84-Zellen gehäuft Unterschiede zwischen FÜ und SCFA-Gemischen auftraten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

5.5 Apoptose

Da aus Vorversuchen bekannt war, dass die FÜ und SCFA-Gemische erst ab einer Konzentration von 50 % Apoptose induzierten, wurde bei den Apoptoseversuchen nur mit dieser Konzentration gearbeitet. Höhere Konzentrationen wurden nicht verwendet, da sonst bei 24-stündiger Inkubationszeit den Zellen nicht genügend Nährstoffe aus dem Zellkulturmedium zur Verfügung gestanden wären.

Bei HT29- und HT29 Clon 19A-Zellen induzierten die SCFA-Gemische zum Teil deutlich mehr Apoptose als die entsprechenden FÜ. In den FÜ sind vermutlich Inhaltsstoffe vorhanden, die die Apoptoseinduktion durch SCFA hemmen.

Wie auch beim Cytotoxizitäts- und Proliferationstest gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen FÜ, so dass auch für die Apoptoseinduktion gilt,

dass die SCFA-Konzentrationen der einzelnen FÜ zu ähnlich waren, um im Testsystem deutliche Differenzen in der Apoptoseinduktion zu erzielen. Für die SCFA-Gemische trifft dies ebenfalls zu.

In verschiedenen Studien wurden Toxizität, proliferationshemmende, apoptoseinduzierende und Zellzyklus beeinflussende Eigenschaften von Faeceswasser untersucht [Rieger *et al.*, 1999; Haza *et al.*, 2000; Zeng & Davis, 2003]. Die Zusammensetzung der wässrigen Phase von Faeces soll größeren Einfluss auf das Colonepithel haben als Bestandteile, die z.B. an Bakterien oder Nahrungsmittelreste gebunden sind. Eigene Versuche mit Faeceswasser zeigten, dass bereits bei einer Konzentration von 5 %, also in 10fach höherer Verdünnung als die FÜ verwendet wurden, bei HT29-Zellen eine deutliche Apoptosinduktion erzielt werden konnte. Die Anzahl apoptotischer Zellen war zum Teil sogar höher als bei der Positiv-Kontrolle mit den Apoptoseinduktoren Staurosporin und Brefeldin A. Daher können die Ergebnisse mit den FÜ nur bedingt mit denen aus anderen Studien mit Faeceswasser verglichen werden. Zum einen spielt dabei die für den Fermentationsprozess notwendige Verdünnung von Faeces mit Medium eine Rolle, zum anderen stehen den Bakterien, außer den definierten Mediumbestandteilen, ausschließlich die zu untersuchenden Kohlenhydrate zur Fermentation zur Verfügung, wodurch Verschiebungen in der Bakterienflora entstehen können.

5.5.1 Zellzyklus

Bei der Zellzyklusmessung wurden deutliche Unterschiede zwischen FÜ und SCFA-Gemischen sichtbar: Bei HT29-Zellen führten die FÜ zu einem G2-Arrest, die Inkubation mit analogen SCFA-Gemischen hatte eine drastische Abnahme der Zellen in der S-Phase zur Folge, die G0/G1- und die G2/M-Phase blieben unbeeinflusst.

Staurosporin und Brefeldin A hatten keine signifikanten Effekte auf den Zellzyklus bei HT29-Zellen. Dies widerspricht Daten aus anderen Studien: So konnten z.B. Qiao *et al.* bei HT29-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 0,4 μM Staurosporin einen G2-Arrest nachweisen [Qiao *et al.*, 1996]. Die Zelldichte, bei der die Zellen mit Staurosporin inkubiert wurden, ist aus der Publikation allerdings nicht ersichtlich. Die Zellzyklus-Verteilung der Negativ-Kontrolle (G0/G1: 33 %, S: 35 %, G2/M: 12 %) lässt jedoch darauf schließen, dass die HT29-Zellen bei einer weitaus geringeren Zelldichte als in dieser Arbeit behandelt wurden (DMEM-Kontrolle: G0/G1: 70 %, S: 18 %, G2/M: 12 %).

G2/M: 12 %). Darauf weist der nur halb so große Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase und der mehr als doppelt so hohe Anteil der Zellen in der S-Phase bei der Studie von Qiao *et al.* hin. Da Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase empfindlicher auf toxische Einflüsse reagieren, erklärt sich wahrscheinlich dadurch der fehlende signifikante Effekt bei dieser Arbeit, bei der zum Inkubationszeitpunkt die Zellen subkonfluent vorlagen, was den Bedingungen *in vivo* eher entspricht. Es kam zwar zu einer leichten Erhöhung der Zellanteile in der G2/M-Phase, der Effekt war aber nicht signifikant. Ein synergistischer Effekt durch die Kombination von Staurosporin mit Brefeldin A, wie er bei der Apoptosinduktion vorliegt, traf für den Zellzyklus offensichtlich nicht zu. Heerdt *et al.* wiesen bei SW620-Coloncarcinom-Zellen Apoptoseinduktion durch Staurosporin nach, bevor ein G2/M-Arrest stattfand [Heerdt *et al.*, 2000]. Möglicherweise hätte auch bei HT29-Zellen eine länger als 24 Stunden dauernde Inkubation einen signifikanten G2-Arrest bewirkt. Die Verlängerung der Inkubationszeit war aber bei dieser Arbeit nicht möglich, da Zellzyklus- und Apoptoseversuche aus demselben Versuchsansatz heraus durchgeführt wurden, um einen direkten Vergleich der Ergebnisse aus beiden Tests zu ermöglichen. Bei einer längeren Inkubationszeit würden bereits zu viele Zellen von der Apoptose in Nekrose übergehen, so dass die Ergebnisse der Apoptoseversuche verfälscht würden.

Bei HT29 Clon 19A-Zellen führten alle FÜ zu einem G1-Arrest und zum Teil zu einer Erniedrigung der S-Phase. Die Inkubation mit SCFA-Gemischen hatte nur zum Teil einen G1-Arrest zu Folge, der Anteil der Zellen in der S-Phase war hingegen bei allen SCFA-Gemischen drastisch vermindert. Staurosporin und Brefeldin A bewirkten eine signifikante Verminderung der S-Phase.

Bei T84-Zellen kam es nach Inkubation mit den FÜ zu einem G2-Arrest, die S-Phase war signifikant vermindert. Die SCFA-Gemische führten hingegen zu einem gleichzeitigen G1- und G2-Arrest bei gleichzeitiger Verminderung der S-Phase. Staurosporin und Brefeldin A bewirkten einen G2-Arrest bei gleichzeitiger Absenkung der G1- und S-Phase.

Offensichtlich befinden sich in den FÜ ein oder mehrere Inhaltsstoffe, die den Zellzyklus auf andere Weise als die SCFA beeinflussen. Die DNA-Synthese der Carcinom-Zelllinien wurde jedenfalls durch die SCFA-Gemische stärker gehemmt als durch die

FÜ, was die Ergebnisse aus den Apoptoseversuchen bestätigt, in denen die SCFA-Gemische stärker Apoptose induzieren konnten als die FÜ.

In künftigen Studien sollten die Wirkungen der FÜ und SCFA-Gemische auf die verschiedenen Zellzyklusphasen detaillierter untersucht werden, so z.B. durch Zeitkinetiken mit Nachweis der synthetisierten Zellzyklusproteine (Cycline) in den verschiedenen Zellzyklusphasen.

5.5.2 Elektrophysiologische Untersuchungen in Ussing-Kammern

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen in Ussing-Kammern wurden HT29 Clon 19A- und T84-Zellen auf permeablen Trägermembranen kultiviert, bis sie vollständig ausdifferenziert waren. Die erfolgte Differenzierung wurde durch einen stabilen hohen transepithelialen Widerstand nachgewiesen.

SCFA, als Einzelsubstanzen in Konzentrationen bis zu 150 mM auf die mucosale Seite der Monolayer gegeben, sowie die für diese Arbeit verwendeten FÜ und SCFA-Gemische zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf den Kurzschlussstrom I_{sc} und auf den transepithelialen Widerstand beider Zelllinien. In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass Na-Butyrat die PGE₂-stimulierte Chloridsekretion bei T84-Zellen hemmen kann, selbst aber keine Auswirkungen auf die Chloridsekretion hat. Es wurden aber nur Konzentrationen bis 50 mM verwendet und auch keine SCFA-Gemische. Außerdem wurden die Zellen mit Butyrat vorinkubiert, während bei der vorliegenden Arbeit die SCFA direkt in die Ussing-Kammern auf die mucosale Seite gegeben wurde [Resta-Lenert *et al.*, 2001].

Für künftige Studien sollten für die FÜ und SCFA-Gemische andere Inkubationsmodelle gewählt werden, so z.B. eine Vorinkubation der Zellen mit FÜ bzw. SCFA und Messung des Einflusses der Vorinkubation auf PGE₂-stimulierte Effekte.

5.6 HT29, HT29 Clon 19A und T84: Colonicarcinom-Zelllinien mit unterschiedlichen Differenzierungsmöglichkeiten und ihre Verwendung für *In vitro*-Versuche

Für die vorliegende Arbeit wurden Colonicarcinom-Zelllinien mehrerer Differenzierungsstadien ausgewählt:

- HT29-Zellen wachsen bei hoher Glucoseversorgung und in serumhaltigem Medium (Standardbedingungen) undifferenziert als Multilayer unpolare Zellen. Sie werden auch als pluripotente Zellen bezeichnet, weil durch verschiedene Behandlungen (z.B. Entzug von Glucose und Ersatz durch Galactose oder Inosin, Inkubation mit Butyrat) viele verschiedene Differenzierungsmuster erreicht werden können [Zweibaum *et al.*, 1991].
- HT29 Clon 19A-Zellen ist ein permanent differenzierter Zellclon aus HT29, entstanden durch 3-wöchige intermittierende Behandlung mit Butyrat. HT29 Clon 19A wachsen postkonfluent als polarisiertes Monolayer und bilden Dome, ein Zeichen für gerichteten Transport in den Zellen [Augeron & Laboisie, 1984; Zweibaum *et al.*, 1991].
- T84-Zellen sind differenzierte Zellen mit elektrogener Chloridsekretion, die als Monolayer polare Zellen wachsen und Dome bilden. [Dharmasathaphorn *et al.*, 1984; Zweibaum *et al.*, 1991].

Da die Verwendung normaler humaner Colonzellen bzw. von Colonmucosa für das Screening einer größeren Anzahl an Substanzen zu aufwändig und nur für Kurzzeitversuche möglich ist, sollten durch die Verwendung differenzierter Colonicarcinom-Zelllinien die Bedingungen so physiologisch wie möglich gewählt werden und ein Vergleich mit undifferenzierten HT29 erfolgen. Die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien lassen jedoch nur schwer einen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Reaktion auf die Inkubation mit Testsubstanzen erkennen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass mit höherem Malignitätsgrad die Resistenz z.B. gegenüber Apoptoseinduktoren höher ist als bei differenzierten Zellen. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Apoptosetests zeigten aber sogar, dass die stärker differenzierten Zelllinien HT29 Clon 19A und T84 nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin und Brefeldin A

eine viel niedrigere Apoptoserate erreichen als die undifferenzierten HT29-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen eine frühere Studie, bei der HT29- und FHC-Zellen (Fetal Human Colon Cells) mit Faeceswasser, SCFA und Gallensäuren inkubiert wurden [Haza *et al.*, 2000].

Eigene Untersuchungen mit SCFA als Einzelsubstanzen ließen ebenfalls keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad der Zelllinien und SCFA-Wirkung erkennen [Roser *et al.*, 2002].

Für zukünftige Studien mit präventiv wirksamen Substanzen wäre es wünschenswert, auf Zellkulturmodelle zurückgreifen zu können, die physiologisch mehr dem normalen Colonepithel entsprechen. Die einzige bis heute verfügbare, nicht transformierte normale Colonepithel-Zelllinie ist NCOL-1. NCOL-1-Zellen wurden 1996 von Deveney *et al.* mittels eines speziellen Verfahrens aus normalem Colongewebe gewonnen und können permanent kultiviert werden [Deveney *et al.*, 1996]. Neueste Untersuchungen des Karyotyps und des Genotyps zeigten jedoch, dass NCOL-1-Zellen nicht normalen Epithelzellen entsprechen, sondern der Colonepithel-Zelllinie LoVo. Vermutlich liegt eine Kreuzkontamination der NCOL-1 mit der Carcinom-Zelllinie vor [Melcher *et al.*, 2005]. Bis zur Etablierung einer permanenten Zelllinie, die normalen Colonepithelzellen entspricht, bleibt daher nur die Verwendung der bisher erhältlichen Colonepithel-Zelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade oder für spezielle Fragestellungen die Isolierung von Colonepithelzellen aus Biopsie- oder Operationsmaterial.

5.7 Perspektiven

Epidemiologische Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der präventiven Wirkung von Ballaststoffen bei colorectalen Carcinomen [Fuchs *et al.*, 1999; Schatzkin *et al.*, 2000; Bingham *et al.*, 2003]. Damit stehen die epidemiologischen Daten zum Teil im Widerspruch zu vielversprechenden Ergebnissen aus *in vitro*- und Tierversuchen, bei denen ein präventiver Effekt von SCFA, vor allem von Butyrat, gegen Dickdarmkrebs nachgewiesen wurde. Gerade lösliche Ballaststoffe wie sie in Obst und Gemüse vorkommen und Resistente Stärke oder andere Poly- und Oligosaccharide als Ausgangssubstanzen bakterieller Fermentation sollten in zukünftigen Studien besondere Beachtung finden. Der zusätzlich protektive Effekt z.B. von Vitaminen und sekundären

Pflanzenstoffen in Obst und Gemüse darf bei der Untersuchung isolierter Einzelsubstanzen nicht außer Acht gelassen werden.

Die Verwendung von Überständen aus *in vitro*-Fermentationen sollte bei der vorliegenden Arbeit als Vorstudie für humane Interventionsstudien dienen, um beurteilen zu können, inwieweit die *in vitro*-Fermentation Interventionsstudien ergänzen oder zum Teil sogar ersetzen kann. Eigene Untersuchungen zeigten, dass Faeceswasser bedeutend stärkere cytotoxische, proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Eigenschaften besitzt als FÜ. Dies liegt zum einen daran, dass die Faecesproben für die *in vitro*-Fermentation mit Kulturmedium verdünnt werden müssen, zum anderen können in der Zeit der Probenaufbereitung für die Fermentation Verschiebungen in der Mikroflora entstehen, die die Zusammensetzung der FÜ im Vergleich zu Faeceswasser verändern. Ob das SCFA-Muster nach *in vitro*-Fermentation dem *in vivo* entspricht, muss in nachfolgenden Interventionsstudien mit denselben Oligosacchariden geklärt werden. Erst dann kann abschließend beurteilt werden, ob die *in vitro*-Fermentation eine sinnvolle Ergänzung zur Interventionsstudie sein kann.

6 Literatur

Abrahamse,S.L., Pool-Zobel,B.L., Rechkemmer,G. (1999). Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* 20, 629-634.

Alberts,D.S., Martinez,M.E., Roe,D.J., Guillen-Rodriguez,J.M., Marshall,J.R., van Leeuwen,J.B., Reid,M.E., Ritenbaugh,C., Vargas,P.A., Bhattacharyya,A.B., Earnest,D.L., Sampliner,R.E. (2000). Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N.Engl.J.Med.* 342, 1156-1162.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2004). Krebs in Deutschland. Saarbrücken.

Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am BgVV (2000). Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln. *Ernährungs-Umschau* 47, 191-195.

Augeron,C., Laboisse,C.L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 44, 3961-3969.

Bingham,S.A. (1999). High-meat diets and cancer risk. *Proc.Nutr.Soc.* 58, 243-248.

Bingham,S.A., Day,N.E., Luben,R., Ferrari,P., Slimani,N., Norat,T., Clavel-Chapelon,F., Kesse,E., Nieters,A., Boeing,H., Tjonneland,A., Overvad,K., Martinez,C., Dorronsoro,M., Gonzalez,C.A., Key,T.J., Trichopoulou,A., Naska,A., Vineis,P., Tumino,R., Krogh,V., Bueno-de-Mesquita,H.B., Peeters,P.H., Berglund,G., Hallmans,G., Lund,E., Skeie,G., Kaaks,R., Riboli,E. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361, 1496-1501.

Brown,R.D., Linden,M.D., Mackowiak,P., Kubus,J.J., Zarbo,R.J., Rabinovitch,P.S. (1996). The effect of number of histogram events on reproducibility and variation of flow cytometric proliferation measurement. *Am.J.Clin.Pathol.* 105, 696-704.

Burkitt,D.P., Trowell,H.C. (1975). Refined Carbohydrate Foods and Disease. London, New York, San Francisco: Academic Press.

Cai,J., Chen,Y., Murphy,T.J., Jones,D.P., Sartorelli,A.C. (2004). Role of caspase activation in butyrate-induced terminal differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 424, 119-127.

Chantret,I., Barbat,A., Dussaulx,E., Brattain,M.G., Zweibaum,A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 48, 1936-1942.

Cuff,M.A., Lambert,D.W., Shirazi-Beechey,S.P. (2002). Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J.Physiol* 539, 361-371.

Cummings,J.H., Beatty,E.R., Kingman,S.M., Bingham,S.A., Englyst,H.N. (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br.J.Nutr.* 75, 733-747.

Cummings,J.H., Pomare,E.W., Branch,W.J., Naylor,C.P., Macfarlane,G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221-1227.

Deveney,C.W., Rand-Luby,L., Rutten,M.J., Luttrupp,C.A., Fowler,W.M., Land,J., Meichsner,C.L., Farahmand,M., Sheppard,B.C., Crass,R.A., Deveney,K.E. (1996). Establishment of human colonic epithelial cells in long-term culture. *J.Surg.Res.* 64, 161-169.

DeVries,J.W. (2003). On defining dietary fibre. *Proc.Nutr.Soc.* 62, 37-43.

Dharmasathaphorn,K., McRoberts,J.A., Mandel,K.G., Tisdale,L.D., Masui,H. (1984). A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am.J.Physiol* 246, G204-G208.

Dietary Fiber Definition Committee (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 46, 112-126.

Dolara,P., Caderni,G., Salvadori,M., Morozzi,G., Fabiani,R., Cresci,A., Orpianesi,C., Trallori,G., Russo,A., Palli,D. (2002). Fecal levels of short-chain fatty acids and bile acids as determinants of colonic mucosal cell proliferation in humans. *Nutr.Cancer* 42, 186-190.

Duncan,S.H., Holtrop,G., Lobley,G.E., Calder,A.G., Stewart,C.S., Flint,H.J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br.J.Nutr.* 91, 915-923.

Emenaker,N.J., Calaf,G.M., Cox,D., Basson,M.D., Qureshi,N. (2001). Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J.Nutr.* 131, 3041S-3046S.

Englyst,H.N., Kingman,S.M., Cummings,J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur.J.Clin.Nutr.* 46 *Suppl* 2, S33-S50.

Fadok,V.A., Voelker,D.R., Campbell,P.A., Cohen,J.J., Bratton,D.L., Henson,P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.* *148*, 2207-2216.

Fearon,E.R., Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759-767.

Fernandes,J., Rao,A.V., Wolever,T.M. (2000). Different substrates and methane producing status affect short-chain fatty acid profiles produced by In vitro fermentation of human feces. *J.Nutr.* *130*, 1932-1936.

Fuchs,C.S., Giovannucci,E.L., Colditz,G.A., Hunter,D.J., Stampfer,M.J., Rosner,B., Speizer,F.E., Willett,W.C. (1999). Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N.Engl.J.Med.* *340*, 169-176.

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*, 327-334.

Grady,W.M., Markowitz,S.D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* *3*, 101-128.

Gryfe,R., Swallow,C., Bapat,B., Redston,M., Gallinger,S., Couture,J. (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr.Probl.Cancer* *21*, 233-300.

Guarner,F., Malagelada,J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* *361*, 512-519.

Halestrap,A.P., Price,N.T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem.J.* *343 Pt 2*, 281-299.

Haza,A.I., Glinghammar,B., Grandien,A., Rafter,J. (2000). Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr.Cancer* *36*, 79-89.

Heerdt,B.G., Houston,M.A., Mariadason,J.M., Augenlicht,L.H. (2000). Dissociation of staurosporine-induced apoptosis from G2-M arrest in SW620 human colonic carcinoma cells: initiation of the apoptotic cascade is associated with elevation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$). *Cancer Res.* *60*, 6704-6713.

Heppner Goss,K., Groden,J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J.Clin.Oncol.* *18*, 1967-1979.

Hughes,R., Magee,E.A., Bingham,S. (2000). Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr.Issues Intest.Microbiol.* *1*, 51-58.

Huycke,M.M., Gaskins,H.R. (2004). Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 229, 586-597.

Jacobs,E.T., Giuliano,A.R., Roe,D.J., Guillen-Rodriguez,J.M., Alberts,D.S., Martinez,M.E. (2002). Baseline dietary fiber intake and colorectal adenoma recurrence in the wheat bran fiber randomized trial. *J.Natl.Cancer Inst.* 94, 1620-1625.

Johnson,I.T. (2002). Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem.Toxicol.* 40, 1171-1178.

Kalliomaki,M., Kirjavainen,P., Eerola,E., Kero,P., Salminen,S., Isolauri,E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J.Allergy Clin.Immunol.* 107, 129-134.

Kanazawa,K., Konishi,F., Mitsuoka,T., Terada,A., Itoh,K., Narushima,S., Kume-mura,M., Kimura,H. (1996). Factors influencing the development of sigmoid colon cancer. Bacteriologic and biochemical studies. *Cancer* 77, 1701-1706.

Kerr,J.F., Wyllie,A.H., Currie,A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257.

Kirjavainen,P.V., Arvola,T., Salminen,S.J., Isolauri,E. (2002). Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* 51, 51-55.

Kishida,T., Taguchi,F., Feng,L., Tatsuguchi,A., Sato,J., Fujimori,S., Tachikawa,H., Tamagawa,Y., Yoshida,Y., Kobayashi,M. (1997). Analysis of bile acids in colon residual liquid or fecal material in patients with colorectal neoplasia and control subjects. *J.Gastroenterol.* 32, 306-311.

Kobayashi,H., Tan,E.M., Fleming,S.E. (2003). Sodium butyrate inhibits cell growth and stimulates p21WAF1/CIP1 protein in human colonic adenocarcinoma cells independently of p53 status. *Nutr.Cancer* 46, 202-211.

Kolligs,F.T., Bommer,G., Goke,B. (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 66, 131-144.

Lagergren,J., Ye,W., Ekbo,A. (2001). Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 121, 542-547.

Lambert,D.W., Wood,I.S., Ellis,A., Shirazi-Beechey,S.P. (2002). Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br.J.Cancer* 86, 1262-1269.

Lamberti,C., Caspari,R., Friedl,W., Sauerbruch,T., Propping,P. (1996). Erblisches Kolonkarzinom: Symptomatik, Diagnostik und Krebsvorsorge. *Deutsches Ärzteblatt* 93, A-1398-A-1403.

- Langkilde,A.M., Champ,M., Andersson,H. (2002). Effects of high-resistant-starch banana flour (RS(2)) on in vitro fermentation and the small-bowel excretion of energy, nutrients, and sterols: an ileostomy study. *Am.J.Clin.Nutr.* 75, 104-111.
- Lina,B.A., Jonker,D., Koziowski,G. (2002). Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies. *Food Chem.Toxicol.* 40, 1375-1381.
- Lu,L., Walker,W.A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am.J.Clin.Nutr.* 73, 1124S-1130S.
- Madigan,M.T., Martinko,J.M., Parker,J. (2001). Brock Mikrobiologie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Martin,H.M., Campbell,B.J., Hart,C.A., Mporfu,C., Nayar,M., Singh,R., Englyst,H., Williams,H.F., Rhodes,J.M. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127, 80-93.
- Melcher,R., Maisch,S., Koehler,S., Bauer,M., Steinlein,C., Schmid,M., Kudlich,T., Schaubert,J., Luehrs,H., Menzel,T., Scheppach,W. (2005). SKY and genetic fingerprinting reveal a cross-contamination of the putative normal colon epithelial cell line NCOL-1. *Cancer Genet.Cytogenet.* 158, 84-87.
- Mentschel,J., Claus,R. (2003). Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* 52, 1400-1405.
- Miyauchi,S., Gopal,E., Fei,Y.J., Ganapathy,V. (2004). Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J.Biol.Chem.* 279, 13293-13296.
- Muir,J.G., Yeow,E.G., Keogh,J., Pizzey,C., Bird,A.R., Sharpe,K., O'Dea,K., Macrae,F.A. (2004). Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *Am.J.Clin.Nutr.* 79, 1020-1028.
- Murakami,H., Masui,H. (1980). Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77, 3464-3468.
- Nicoletti,I., Migliorati,G., Pagliacci,M.C., Grignani,F., Riccardi,C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 139, 271-279.
- Ott,S.J., Musfeldt,M., Wenderoth,D.F., Hampe,J., Brant,O., Folsch,U.R., Timmis,K.N., Schreiber,S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685-693.

- Pai,R., Tarnawski,A.S., Tran,T. (2004). Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol.Biol.Cell* 15, 2156-2163.
- Pinto,M., Appay,M.-D., Simon-Assmann,P., Chevalier,G., Dracopoli,N., Fogh,J., Zweibaum,A. (1982). Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol.Cell* 44, 193-196.
- Pitari,G.M., Zingman,L.V., Hodgson,D.M., Alekseev,A.E., Kazerounian,S., Bienengraeber,M., Hajnoczky,G., Terzic,A., Waldman,S.A. (2003). Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 2695-2699.
- Potten,C.S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am.J.Physiol* 273, G253-G257.
- Pouteau,E., Piloquet,H., Maugeais,P., Champ,M., Dumon,H., Nguyen,P., Krempf,M. (1996). Kinetic aspects of acetate metabolism in healthy humans using [1-13C] acetate. *Am.J.Physiol* 271, E58-E64.
- Priebe,M.G., Vonk,R.J., Sun,X., He,T., Harmsen,H.J., Welling,G.W. (2002). The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *Eur.J.Nutr.* 41 *Suppl 1*, I2-10.
- Pryde,S.E., Duncan,S.H., Hold,G.L., Stewart,C.S., Flint,H.J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol.Lett.* 217, 133-139.
- Qiao,D., Gaitonde,S.V., Qi,W., Martinez,J.D. (2001). Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 22, 957-964.
- Qiao,L., Koutsos,M., Tsai,L.L., Kozoni,V., Guzman,J., Shiff,S.J., Rigas,B. (1996). Staurosporine inhibits the proliferation, alters the cell cycle distribution and induces apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 107, 83-89.
- Rao,R.V., Hermel,E., Castro-Obregon,S., del Rio,G., Ellerby,L.M., Ellerby,H.M., Bredesen,D.E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J.Biol.Chem.* 276, 33869-33874.
- Resta-Lenert,S., Truong,F., Barrett,K.E., Eckmann,L. (2001). Inhibition of epithelial chloride secretion by butyrate: role of reduced adenylyl cyclase expression and activity. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281, C1837-C1849.
- Reuter,G. (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr.Issues Intest.Microbiol.* 2, 43-53.
- Riboli,E., Norat,T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am.J.Clin.Nutr.* 78, 559S-569S.

Rieger,M.A., Parlesak,A., Pool-Zobel,B.L., Rechkemmer,G., Bode,C. (1999). A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis* 20, 2311-2316.

Roberfroid,M.B. (1998). Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br.J.Nutr.* 80, S197-S202.

Roser, S., Lang, H., and Rechkemmer, G. Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf Cytotoxizität, Proliferation und Apoptose humaner Colonicarcinom-Zelllinien. 2002. Proceedings of the German Nutrition Society. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.

Roser,S., Pool-Zobel,B.L., Rechkemmer,G. (2001). Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat.Res.* 497, 169-175.

Rousset,M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68, 1035-1040.

Ruppin,H., Bar-Meir,S., Soergel,K.H., Wood,C.M., Schmitt,M.G., Jr. (1980). Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 78, 1500-1507.

Schatzkin,A., Lanza,E., Corle,D., Lance,P., Iber,F., Caan,B., Shike,M., Weissfeld,J., Burt,R., Cooper,M.R., Kikendall,J.W., Cahill,J. (2000). Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N.Engl.J.Med.* 342, 1149-1155.

Seksik,P., Rigottier-Gois,L., Gramet,G., Sutren,M., Pochart,P., Marteau,P., Jian,R., Dore,J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237-242.

Senderowicz,A.M., Sausville,E.A. (2000). Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J.Natl.Cancer Inst.* 92, 376-387.

Shao,R.G., Shimizu,T., Pommier,Y. (1996). Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53. *Exp.Cell Res.* 227, 190-196.

Shao,R.G., Shimizu,T., Pommier,Y. (1997). 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Exp.Cell Res.* 234, 388-397.

Shapiro,H.M. (1994). *Practical Flow Cytometry*. New York: Wiley-Liss.

Siavoshian,S., Segain,J.P., Kornprobst,M., Bonnet,C., Cherbut,C., Galmiche,J.P., Blotiere,H.M. (2000). Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46, 507-514.

Singh,B., Halestrap,A.P., Paraskeva,C. (1997). Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 18, 1265-1270.

Steer,T., Carpenter,H., Tuohy,K., Gibson,G.R. (2000). Perspectives in the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 13, 229-254.

Topping,D.L., Fukushima,M., Bird,A.R. (2003). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proc.Nutr.Soc.* 62, 171-176.

Vermes,I., Haanen,C., Steffens-Nakken,H., Reutelingsperger,C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184, 39-51.

Vernia,P., Breuer,R.I., Gnaedinger,A., Latella,G., Santoro,M.L. (1984). Composition of fecal water. Comparison of "in vitro" dialysis with ultrafiltration. *Gastroenterology* 86, 1557-1561.

Vogt,J.A., Pencharz,P.B., Wolever,T.M. (2004). L-Rhamnose increases serum propionate in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 80, 89-94.

Wachtershauser,A., Stein,J. (2000). Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur.J.Nutr.* 39, 164-171.

Williams,B.A., Tannock,G.W., Tamminga,S. (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews* 14, 207-227.

Wright,E.M., Turk,E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447, 510-518.

Wu,K., Willett,W.C., Fuchs,C.S., Colditz,G.A., Giovannucci,E.L. (2002). Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J.Natl.Cancer Inst.* 94, 437-446.

Zeng,H., Davis,C.D. (2003). Down-regulation of proliferating cell nuclear antigen gene expression occurs during cell cycle arrest induced by human fecal water in colonic HT-29 cells. *J.Nutr.* 133, 2682-2687.

Zoetendal,E.G., Akkermans,A.D., De Vos,W.M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* 64, 3854-3859.

Zweibaum,A., Laburthe,M., Grasset,E., Louvard,D. (1991). Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function. In: *Handbook Of Physiology. Section 6: The Gastrointestinal System*, ed. S.G.Schultz, M.Field, R.A.Frizzell, B.B.Rauner Bethesda, Maryland: American Physiological Society, 223-255.

7 Tabellenanhang

Tab. A 1: Cytotoxische Effekte der FÜ und SCFA-Gemische bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen nach 24 h Inkubation, ausgedrückt als relative Vitalität der Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Testsubstanzen). Eine cytotoxische Wirkung wurde definiert ab einer Vitalität unter 90 % im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Signifikante Unterschiede wurden ebenfalls im Vergleich zur Negativ-Kontrolle dargestellt, MW±SD, n=3-7.

	Konzentration [%]	HT29	HT29 Clon 19A	T84
FÜ „Kontrolle“	2	92,0±11,0	94,5±4,9*	101,1±3,9
	10	89,8±8,9*	99,4±9,8	113,2±10,3*
	50	91,9±10,5	64,1±9,6***	96,9±6,7
SCFA „Kontrolle“	2	91,8±5,3*	95,2±9,8	91,5±8,1*
	10	90,3±6,2*	93,0±7,7*	96,7±4,6
	50	72,3±7,6*	59,4±6,9***	87,2±7,2**
FÜ BC-O 165	2	90,8±9,4	88,7±5,4***	107,4±5,7
	10	84,9±10,9*	69,3±6,5***	111,8±10,6
	50	76,4±13,8*	53,8±11,9***	66,6±12,0**
SCFA BC-O 165	2	95,1±3,8*	90,2±5,2***	96,4±12,4
	10	84,9±4,3*	65,5±7,4***	105,2±8,3
	50	67,1±10,4*	58,3±10,3***	90,7±10,6
FÜ BC-O 299	2	94,1±4,5*	86,1±10,8***	105,0±3,8
	10	95,2±4,3**	77,2±8,2***	114,0±12,3
	50	78,9±15,9**	47,7±6,5***	49,7±6,0**
SCFA BC-O 299	2	91,5±5,1**	92,6±7,3	95,5±4,8
	10	87,1±6,5**	69,5±5,8***	101,8±5,3
	50	62,5±11,0**	56,7±11,4***	87,6±12,2
FÜ BC-P 114	2	92,7±2,8	92,4±5,1*	104,5±7,3
	10	95,4±4,1	73,7±7,8*	105,2±9,0
	50	62,6±6,1**	59,4±5,0*	54,1±20,5*
SCFA BC-P 114	2	98,3±3,8	97,1±9,7	100,9±9,8
	10	94,8±3,8	73,4±7,7*	102,2±9,6
	50	64,9±5,7**	65,5±4,8*	93,4±13,4

Tab. A 2: Proliferationshemmende Effekte der FÜ und SCFA-Gemische bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen nach 5-tägiger Inkubation, ausgedrückt als relatives Wachstum der Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Testsubstanzen). Signifikante Unterschiede wurden ebenfalls im Vergleich zur Negativ-Kontrolle dargestellt, MW±SD, n=3-7.

	Konzentration [%]	HT29	HT29 Clon 19A	T84
FÜ „Kontrolle“	2	84,3 ± 15,9*	97,8 ± 8,9	88,7 ± 11,8*
	10	71,2 ± 10,0*	104,8 ± 19,9	75,6 ± 6,4**
	50	2,1 ± 1,1*	3,2 ± 1,9*	11,2 ± 7,3**
SCFA „Kontrolle“	2	71,9 ± 23,9*	77,9 ± 9,3*	76,7 ± 21,2*
	10	60,4 ± 18,1*	82,5 ± 4,0*	63,1 ± 6,7*
	50	32,6 ± 8,8*	27,4 ± 9,6*	25,7 ± 6,9*
FÜ BC-O 165	2	75,1 ± 8,8*	92,1 ± 7,2	68,2 ± 7,0**
	10	60,5 ± 4,3*	77,8 ± 14,4*	54,5 ± 6,3**
	50	-1,125 ± 0,7*	-1,6 ± 1,2*	-0,9 ± 0,9**
SCFA BC-O 165	2	62,7 ± 24*	82,8 ± 3,5*	69,7 ± 10,9*
	10	49,9 ± 13,6*	62,9 ± 2,7*	35,5 ± 4,0*
	50	0,8 ± 0,8*	0,5 ± 0,3*	4,7 ± 1,5*
FÜ BC-O 299	2	80,6 ± 7,8*	92,2 ± 8,3	79,8 ± 4,6**
	10	73,9 ± 9,2*	86,7 ± 16,8	55,5 ± 7,9**
	50	-0,1 ± 0,8*	-0,4 ± 0,5*	-1,0 ± 0,6**
SCFA BC-O 299	2	65,4 ± 20,8*	83,4 ± 5,0*	75,7 ± 7,8*
	10	58,9 ± 10,4*	66,3 ± 5,7*	37,2 ± 2,7*
	50	1,9 ± 0,9*	0,2 ± 0,4*	12,4 ± 4,4*
FÜ BC-P 114	2	76,7 ± 7,8*	entf. ²	73,9 ± 2,9*
	10	68,8 ± 6,7*	entf.	51,9 ± 8,8*
	50	0,1 ± 0,5*	entf.	1,5 ± 0,9*
SCFA BC-P 114	2	73,7 ± 21,6*	entf.	77,9 ± 6,7*
	10	62,5 ± 5,4*	entf.	47,7 ± 5,6*
	50	3,0 ± 0,5*	entf.	9,4 ± 0,9*

² Entfällt: Versuch konnte wegen Substanzmangels nicht durchgeführt werden

Tab. A 3: Annexin V-Test: Apoptoseinduktion durch FÜ und SCFA-Gemische in der Konzentration 50 % bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen (Inkubationszeit 24 h). Angegeben sind apoptotische Zellen in % der gesamten gemessenen Zellen. Signifikante Unterschiede beziehen sich auf die Negativ-Kontrolle, MW±SD, n=4-14.

	HT29	HT29 Clon 19A	T84
DMEM	2,5 ± 1,1	5,6 ± 1,9	5,5 ± 1,6
Stauro / BFA 0,5 µM	35,2 ± 7,9***	18,3 ± 3,3*	15,7 ± 3,1*
FÜ „Kontrolle“	10,0 ± 4,5***	15,6 ± 5,0*	15,5 ± 8,1
SCFA „Kontrolle“	14,4 ± 3,8***	18,7 ± 3,8*	16,4 ± 4,7*
FÜ BC-O 165	8,2 ± 3,0***	8,1 ± 2,4	14,1 ± 3,7*
SCFA BC-O 165	15,3 ± 2,2***	11,2 ± 3,7 ^{p=0,057}	11,6 ± 3,8*
FÜ BC-O 299	8,1 ± 4,7***	7,1 ± 3,1	10,4 ± 3,6*
SCFA BC-O 299	13,4 ± 4,5***	9,2 ± 1,5 ^{p=0,057}	8,9 ± 1,2*
FÜ BC-P 114	10,3 ± 3,4***	4,5 ± 0,3	12,1 ± 1,6*
SCFA BC-P 114	16,7 ± 6,3**	13,1 ± 3,4*	11,1 ± 4,2 ^{p=0,057}

Tab. A 4: Aktivierte Caspase-3: Apoptoseinduktion durch FÜ und SCFA-Gemische in der Konzentration 50 % bei HT29-, HT29 Clon 19A- und T84-Zellen (Inkubationszeit 24 h). Angegeben sind Zellen mit aktivierter Caspase-3 in % der gesamten gemessenen Zellen. Signifikante Unterschiede beziehen sich auf die Negativ-Kontrolle, MW±SD, n=3-5.

	HT29	HT29 Clon 19A	T84
DMEM	1,4 ± 0,6	2,2 ± 0,8	2,9 ± 0,9
Stauro / BFA 0,5 µM	32,1 ± 7,2**	12,8 ± 3,8*	13,5 ± 4,2*
FÜ „Kontrolle“	4,8 ± 1,9*	15,0 ± 4,5*	9,5 ± 4,2 ^{p=0,057}
SCFA „Kontrolle“	16,6 ± 8,3*	19,2 ± 6,2*	8,4 ± 3,9
FÜ BC-O 165	8,6 ± 6,3*	4,5 ± 2,8	6,8 ± 2,1*
SCFA BC-O 165	21,6 ± 5,8*	10,2 ± 2,6*	9,2 ± 4,4
FÜ BC-O 299	5,5 ± 1,8*	4,9 ± 2,9	5,9 ± 2,9
SCFA BC-O 299	20,9 ± 9,9*	9,5 ± 1,5*	9,3 ± 4,2
FÜ BC-P 114	7,6 ± 2,8*	4,7 ± 2,6**	7,9 ± 1,4**
SCFA BC-P 114	15,5 ± 4,5*	10,3 ± 3,1**	6,3 ± 3,8

Tab. A 5: Prozentuale Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit FÜ und SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %. Signifikante Effekte beziehen sich auf die Negativ-Kontrolle, MW±SD, n=4.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
DMEM	69,5 ± 7,5	18,1 ± 6,5	12,3 ± 3,7
Stauro / BFA 0,5 µM	70,0 ± 12,7	12,0 ± 5,9	18,0 ± 8,1
FÜ „Kontrolle“	69,6 ± 5,0	6,3 ± 3,5*	23,3 ± 5,0*
SCFA „Kontrolle“	81,5 ± 4,3 ^{p=0,057}	0,3 ± 0,7*	17,5 ± 4,1
FÜ BC-O 165	64,5 ± 8,6	13,1 ± 9,8	21,7 ± 3,7*
SCFA BC-O 165	79,2 ± 4,9	1,2 ± 0,9*	18,8 ± 4,0
FÜ BC-O 299	65,6 ± 6,1	11,3 ± 8,4	23,7 ± 2,8*
SCFA BC-O 299	80,7 ± 4,6 ^{p=0,057}	1,0 ± 0,9*	18,3 ± 5,0
FÜ BC-P 114	70,4 ± 4,6	4,0 ± 1,3*	24,9 ± 4,3*
SCFA BC-P 114	69,0 ± 14,4	1,7 ± 1,2*	19,0 ± 4,4

Tab. A 6: Prozentuale Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M von HT29 Clon 19A-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit FÜ und SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %. Signifikante Effekte beziehen sich auf die Negativ-Kontrolle, MW±SD, n=3-5.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
DMEM	57,5 ± 5,7	20,9 ± 6,6	21,7 ± 2,2
Stauro / BFA 0,5 µM	66,3 ± 8,9	8,1 ± 6,6*	25,6 ± 8,2
FÜ „Kontrolle“	75,7 ± 5,0*	6,6 ± 2,5*	17,7 ± 2,6
SCFA „Kontrolle“	72,0 ± 3,3*	1,9 ± 1,9*	26,1 ± 4,5
FÜ BC-O 165	67,8 ± 3,2*	14,3 ± 5,5	17,9 ± 3,1
SCFA BC-O 165	67,6 ± 4,9	1,3 ± 1,4*	31,3 ± 5,5*
FÜ BC-O 299	69,3 ± 2,2*	12,7 ± 3,0	18,1 ± 2,9
SCFA BC-O 299	69,7 ± 6,3*	3,8 ± 1,9*	26,2 ± 8,0
FÜ BC-P 114	70,3 ± 3,3*	13,1 ± 5,1	16,6 ± 1,8*
SCFA BC-P 114	72,5 ± 4,3*	2,3 ± 2,6*	25,2 ± 6,3

Tab. A 7: Prozentuale Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M von T84-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit FÜ und SCFA-Gemischen in der Konzentration 50 %. Signifikante Effekte beziehen sich auf die Negativ-Kontrolle, MW±SD, n=3.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
DMEM	43,8 ± 0,4	42,1 ± 1,7	14,1 ± 1,6
Stauro / BFA 0,5 µM	28,8 ± 1,8*	26,3 ± 2,2*	44,9 ± 3,5*
FÜ „Kontrolle“	53,5 ± 4,3*	22,6 ± 2,7*	23,9 ± 4,2*
SCFA „Kontrolle“	64,5 ± 3,2*	8,9 ± 1,6*	26,6 ± 2,2*
FÜ BC-O 165	43,6 ± 1,7	33,7 ± 0,9*	22,7 ± 2,4*
SCFA BC-O 165	53,0 ± 2,1*	14,1 ± 4,1*	32,9 ± 2,4*
FÜ BC-O 299	49,5 ± 8,4	24,9 ± 5,2*	25,6 ± 3,3*
SCFA BC-O 299	54,8 ± 5,3*	13,5 ± 4,4*	31,8 ± 1,6*
FÜ BC-P 114	47,7 ± 5,5*	28,7 ± 2,5*	23,6 ± 3,0*
SCFA BC-P 114	57,8 ± 6,1*	12,5 ± 2,1*	30,4 ± 3,2*

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Silvia Roser
Geburtsdatum	18.6.1964
Geburtsort	Pforzheim
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1970 - 1974	Grundschule Wilferdingen
1974 - 1983	Hebel-Gymnasium Pforzheim
Juni 1983	Abitur

Berufsausbildung

1983 - 1985	Ausbildung zur Arzthelferin
Juli 1985	Abschluss der Kaufmännischen Berufsschule
1987 - 1989	Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Laborassistentin

Hochschulstudium

Oktober 1992 - Mai 1999	Ernährungswissenschaften an der Universität Hohenheim Vertiefende Fachrichtung: Pharmakologie und Toxikologie der Ernährung Gesamturteil der Diplomprüfung: sehr gut
Mai 1998 - Mai 1999	Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Karlsruhe, Institut für Ernährungsphysiologie Betreuung: Prof. Dr. Dr. G. Rechkemmer Thema: Einfluss von Anthocyanen und von Quercetin auf die Apoptoserate von HT29- und HL60-Zellen

Juni 1999 – Mai 2002 Experimenteller Teil der Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung Karlsruhe, Institut für Ernährungsphysiologie
Betreuung: Prof. Dr. Dr. G. Rechkemmer
Thema: Einfluss kurzkettiger Fettsäuren und mikrobieller Fermentationsprodukte neuartiger Oligosaccharide auf Cytotoxizität, Proliferation und Apoptose von humanen Colocarcinom-Zelllinien

Berufstätigkeit

September 1985 – März 1987 Arzthelferin
Oktober 1989 – September 1992 Medizinisch-Technische Laborassistentin
Juni 1999 – März 2003 Ernährungswissenschaftlerin an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe, Institut für Ernährungsphysiologie
Seit April 2003 Ernährungswissenschaftlerin an der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, am Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

Publikationen

Roser S., Pool-Zobel B.-L., Rechkemmer G. - Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutation Research* 497 (2001), 169-175

Roser S., Lang H., Rechkemmer G. - Wirkungen kurzkettiger Fettsäuren auf Cytotoxizität, Proliferation und Apoptose bei humanen Colocarcinom-Zelllinien. Poster beim 39. Wissenschaftlichen Kongress der DGE, Jena 2002

Lexikon der Ernährung, Gebiet „Sekundäre Pflanzenstoffe“. Spektrum Akademischer Verlag 2001

Watzl B., Bub A., Pretzer G., Roser S., Barth S.W., Rechkemmer G. – Daily moderate amounts of red wine or alcohol have no effect on the immune system of healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (2004), 40-45

Danksagung

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

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. G. Rechkemmer für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die Geduld und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. K. Biesalski für die freundliche Übernahme der Fakultätsbetreuung an der Universität Hohenheim.

Der Südzucker AG, Zentralabteilung Forschung, Entwicklung und Services (ZAFES) in Obrigheim, für die Bereitstellung der Fermentationsüberstände und die Möglichkeit, ein Folgeprojekt anzuschließen. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Vogel, Frau Dr. Koziowski, Herrn Dr. Klingenberg und Herrn Dr. Theis für die Unterstützung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Kerstin Rebscher für kollegiale und freundschaftliche gemeinsame Projektarbeit.

Frau Kerstin Schnäbele für die stetige Hilfsbereitschaft und die konstruktive Kritik bei der Manuskripterstellung.

Frau Marina Giorgi-Kotterba für die praktische Unterstützung im Labor.

Frau Anja Osterhues für die Endkorrektur des Manuskripts.

Allen Kolleginnen und Kollegen an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe, Institut für Ernährungsphysiologie, für die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation und so manches „den Rücken freihalten“.

Meinem lieben Mann für die Geduld und die unentwegte Hilfe und Aufmunterung.