

Aus der  
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Antiproliferative und apoptotische Effekte von Telmisartan in  
humanen Kolonkarzinomzellen durch Aktivierung des Peroxisome  
Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Benjamin Mafura

aus Taita Taveta, Kenia

Datum der Promotion: 05.06.2016



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

## Abstrakt

<b>1</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>11</b>
1.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms.....	11
1.2	Ätiologie des kolorektalen Karzinoms.....	12
1.2.1	Ernährungsbedingte Faktoren .....	12
1.2.2	Genetische Faktoren .....	12
1.2.3	Adenom-Karzinom Sequenz.....	14
1.2.4	Weitere Risikofaktoren.....	14
1.3	Diagnostik, Staging, Therapie und Prognose .....	15
1.4	Der „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor“(PPAR) .....	18
1.4.1	Isoformen von PPAR .....	19
1.4.2	PPAR- $\gamma$ vermittelte Gentranskription .....	19
1.4.3	PPAR- $\gamma$ Liganden .....	20
1.4.4	Antikanzerogene und antiproliferative Mechanismen von PPAR- $\gamma$ Liganden...21	
1.4.5	Effekte von PPAR- $\gamma$ Agonisten beim kolorektalen Karzinom.....	24
1.4.6	Effekte von Telmisartan auf die Regulation von PPAR- $\gamma$ .....	24
1.4.7	Das systemische Renin-Angiotensin-System (RAS).....	24
1.4.8	Das Lokale Angiotensin II System .....	25
1.5	Fragestellung und Hypothese .....	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1	Material .....	27
2.1.1	Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.2	Puffer und Lösungen .....	29
2.1.3	Kits.....	32
2.1.4	Zelllinien.....	33
2.2	Zellbiologische Methoden.....	33
2.2.1	Kultivierung der Kolonkarzinomzelllinien .....	33
2.2.2	Zellvitalität und Zellproliferation .....	35

<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.3.1	RNA-Isolation.....	38
2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA. ....	39
2.3.3	Reverse Transkription: Umschreibung der RNA in cDNA .....	39
2.3.4	Real-Time-quantitative-PCR .....	40
<b>2.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von Pioglitazon und Telmisartan auf Proliferation und Apoptose von humanen Kolonkarzinomzelllinien</b> .....	<b>43</b>
3.1.1	Änderung der Zellviabilität unter Einfluss von Pioglitazon und Telmisartan .....	43
3.1.2	Antiproliferativer Effekt unter Einfluss von Pioglitazon und Telmisartan.....	47
3.1.3	Apoptose-Untersuchungen mittels Caspase 3-7 Assay .....	50
<b>3.2</b>	<b>Regulation der m-RNA-Expression von PPAR-<math>\gamma</math> und AGTR1</b> .....	<b>53</b>
3.2.1	Zelllinien ohne GW9662 Vorbehandlung .....	53
3.2.2	Die Zelllinien mit 2,5 $\mu$ M GW9662 Vorbehandlung.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Publikation</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

13-HODE	13-Hydroxyoctadecadienoic acid, 13(S)-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid
15d-PGJ2	15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2
15-HETE	15-Hydroxyicosatetraenoic acid, 15(S)-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
9-HODE	9-Hydroxyoctadecadienoic acid, 9-hydroxy-10(E),12(Z)-octadecadienoic acid
Ac-DEVD-AFC	7-amido-4-trifluoromethylcoumarin
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
AGTR1	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 Gene
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
ARB	Angiotensin Rezeptor Blocker
AT1R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1
AT2R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 2
ATCC	American Type Culture Collection
BADGE	Bisphenol A diglycidyl ether
BRCA1	breast cancer 1, early onset
CDDO	2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-säure
CDK	Cyclin-dependent-kinases
cDNA	Complementary Desoxy-Ribonucleic Acid
CEA	Carcinoembryonic antigen
CIN	Chromosomeninstabilität

CP	Crossing Point
CT	Cycle Threshold
DBD	DNA-binding domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid
ECACC	European Collection of Cell Culture
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (Hereditäres nicht polypöses Kolorektales Karzinom)
H-RAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene
JNK	C-Jun N-terminal kinases
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
KRK	Kolorektales Karzinom
LBD	Ligand-binding domain
L-FABP	Liver-fatty acid-binding protein
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MEK	Ethanol 100 Vol%
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
MMLV	Moloney Murine Leukämievirus- (M-MLV-) Reverse Transkriptase
mRNA	Messenger Ribonucleic acid

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGAL	Neutrophilgelatinase-associated lipocalin
NR	Nukleärer Rezeptor
N-RAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PG	Prostaglandin
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element
PTEN	Phosphatase und tensin
RAR	Retinoic acid receptor
RAS	Renin-Angiotensin-System
RegIA	Regenerating gene
RNA	Ribonucleic acid
RTq-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
RXR	Retinoid X receptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMAD	Mothers against decapentaplegic
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TR	Thyroid hormone receptor
TSC22	Transforming growth factor simulated clone-22
TZD	Thiazolidinedione
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## **Abstrakt**

### **Antiproliferative und apoptotische Effekte von Telmisarten in humanen Kolonkarzinomzellen durch Aktivierung des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$**

#### **Einleitung**

Telmisartan ist ein synthetischer AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist zur antihypertensiven Therapie. Schupp et al beschrieben 2004 einen PPAR- $\gamma$  Partialagonismus für diese Substanzklasse. Die Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptoren (PPAR) gehören zur Superfamilie der steroidalen Hormonrezeptoren. Diese fungieren als nukleare Transkriptionsfaktoren im Rahmen von Zelldifferenzierung, Apoptose, Inflammation und Angiogenese. Es existieren 3 Subtypen: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  und PPAR- $\gamma$ . PPAR- $\gamma$  wird hauptsächlich und am höchsten im weißen Fettgewebe exprimiert. Das menschliche Kolonepithel zeigt jedoch eine gleichwertige Expression.

#### **Hypothese**

Eine partielle PPAR- $\gamma$ -Aktivierung durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Telmisartan führt in vitro in humanen Kolonkarzinomzellen zu einer Inhibition der Zellproliferation, einer Reduktion der Zellviabilität und einer Induktion der Apoptose.

#### **Material und Methoden**

Humane Kolonkarzinomzelllinien (HT 29, SW 480 und SW 620) wurden mit Telmisartan (0,02 - 2,5 $\mu$ M) und dem Vollagonisten Pioglitazon (0,02 - 2,5 $\mu$ M) als Positivkontrolle für 72h inkubiert. DMSO 0,05% wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Expression von PPAR- $\gamma_1$  und PPAR- $\gamma_2$  in den untersuchten Zelllinien erfolgte vor der Inkubation mit den Testsubstanzen mittels PCR. Die mRNA-Messung der Zielgene PPAR- $\gamma_2$  und Cystatin A nach Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte mittels qRT-PCR. Veränderungen der Zellviabilität und Zellzahl der untersuchten Zelllinien wurden mittels MTT-Proliferations-Assay und der Zellzählung untersucht. Die Apoptoserate wurde mittels Caspase-3/7 Assay bestimmt. Untersucht wurde der Einfluss der Einzelsubstanzen Telmisartan und Pioglitazon und der Einfluss der Kombination beider Testsubstanzen auf die Zellviabilität, Zellzahl und Apoptoserate mit und ohne selektive Blockade des PPAR- $\gamma$  Rezeptors GW9662.

#### **Ergebnisse und Zusammenfassung**

Telmisartan zeigte konzentrationsabhängige antiproliferative- und apoptotische Effekte und eine Herabregulation der Zielgene PPAR- $\gamma$  und AGTR1 im gleichen Umfang wie der PPAR- $\gamma$  Vollagonist Pioglitazon. Nach PPAR- $\gamma$  Blockade mit GW9662 zeigte sich unter Telmisartan

im Gegensatz zu Pioglitazon eine Erhöhung der antiproliferativen und apoptotischen Wirkung, so dass von alternativen Aktivierungswegen ausgegangen werden kann, die in nachfolgenden Studien der Liganden-unabhängigen PPAR- $\gamma$  Aktivierung und PPAR- $\gamma$  unabhängiger Mechanismen untersucht werden sollen.

# **Antiproliferative and apoptotic effects of telmisartan in human colon cancer cells through activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$**

## **Introduction**

Telmisartan is a synthetic AT1 receptor antagonist used in the antihypertensive therapy. Schupp et al described in 2004 a PPAR $\gamma$ -Partialagonismus for this class of substances. The peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) belong to the superfamily of steroidal hormone receptors. These act as a nuclear transcription factors and affect cell differentiation, apoptosis, inflammation and angiogenesis. There are 3 subtypes: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  is expressed mainly in the white adipose tissue. However, the human colonic epithelium shows an equivalent high expression.

## **Hypothesis**

A partial PPAR- $\gamma$  activation by the AT1 Receptor antagonist Telmisartan in human colon carcinoma cells in vitro leads to inhibition of cell proliferation, a reduction of cell viability und induction of apoptosis.

## **Materials and Methods**

The colon carcinoma cell lines (HT 29, SW 480 und SW 620) were treated for 72h with Telmisartan (0.2-2.5 $\mu$ M), full agonist Pioglitazone (0.2-2.5 $\mu$ M) als positive control und DMSO als negative control. The expression of PPAR- $\gamma_1$  and PPAR- $\gamma_2$  in the examined cell lines prior to incubation with the test substances was done using *PCR*. The mRNA determination of target genes PPAR- $\gamma_2$  und Cystatin A after incubation with the test substances was performed by *qRT-PCR*. Changes in cell viability and cell count were determined by MTT assay und cell counting. The Apoptosisrate was deteremined by Caspase-3/7 assay. We examined the influence of individual substances Telmisartan and Pioglitazone as well as the combination of these tests substances with the selective PPAR blocker GW9662 on cell viability, cell count and apoptosis rate.

## **Results and conclusion**

Telmisartan showed concentration dependent antiproliferative- and apoptotic effects and downregulates target genes PPAR- $\gamma$  and AGTR1 in the same extent as the full agonist Pioglitazone. PPAR- $\gamma$  blockade with GW9662 increased the antiproliferative and apoptotic effect contrary to Pioglitazone. PPAR- $\gamma$  activation does not entirely explain this observation und further experimental investigation is necessary particularly on PPAR- $\gamma$  independent mechanisms and ligand-independent PPAR- $\gamma$  activation.

# 1 Einführung

Das kolorektale Karzinom umfasst alle Krebserkrankungen des Dickdarms sowie des Mastdarms. Es entsteht in den meisten Fällen sporadisch. Bei bis zu 20% kann eine hereditäre Genese nachgewiesen werden [1]. 60% der kolorektalen Karzinome entstehen im Dickdarm und 40% im Mastdarm [2, 3]. Aufgrund der Prävalenz, Inzidenz und Mortalität nimmt das kolorektale Karzinom sowohl in Deutschland als auch weltweit eine besondere Stellung in der klinischen und grundlagenwissenschaftlichen Forschung ein.

## 1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist mit 16% der zweithäufigste maligne Tumor und mit ca. 13% die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland [4, 5]. Im Jahr 2010 wurden ca. 34.000 neue Erkrankungen für Männer und ca. 29.000 für Frauen in Deutschland gemeldet [2]. Beim Mann ist das kolorektale Karzinom nach dem Prostatakarzinom bzw. nach dem Mammakarzinom bei der Frau die zweithäufigste Krebserkrankung [5, 6]. Das Bronchialkarzinom hat die höchste Mortalität, gefolgt von dem Dickdarmkrebs bei Männern. Bei der Frau ist das Mammakarzinom die häufigste Krebstodesursache [6]. Insgesamt starben in Deutschland im Jahr 2010 ca. 26.000 Patienten an Dickdarmkrebs [2]. Das Lebenszeitrisiko für einen Deutschen am kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt ca. 6%. Das Risiko daran zu sterben liegt bei 2-3%. Darmkrebs ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern (746.000 Fälle, 10% der Gesamtzahl) sowie die zweithäufigste bei Frauen (614.000 Fälle, 9,2% der Gesamtzahl). Dabei wird die Inzidenz auf 1 Million pro Jahr geschätzt [7]. Fast 60% der Fälle treten in westlichen Industrieländern auf [7]. Die höchsten Inzidenzraten sind dabei in Australien/ Neuseeland und Westeuropa, die niedrigsten werden in Afrika (außer Südafrika) und Süd-Zentralasien geschätzt. Die Inzidenzraten sind bei Männern wesentlich höher als bei Frauen (7:5) [7]. Das KRK zeigt einen höheren Erkrankungsgipfel. Bei Männern zwischen 60 und 84 Jahren liegt die Diagnose bei 70%. Bei Frauen liegt der Erkrankungshöhepunkt bei über 75 Jahren [5]. Nur 2-10% der Fälle konnten bei Patienten, die jünger als 40 Jahre sind, festgestellt werden [8].

Mit über 600.000 Todesfällen jährlich ist das kolorektale Karzinom weltweit die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache. Die Mortalität bei Frauen ist niedriger als bei Männern [7]. Hervorzuheben ist ein großer Unterschied der Häufigkeit zwischen den Bevölkerungsgruppen in verschiedenen geographischen Regionen. Diese Unterschiede sind nicht nur durch genetische Faktoren bedingt. Bei Migranten, die ihren Lebensstil in Hoch-Inzidenzländern führen, zeigt sich eine Erhöhung der Rate des KRK [9]. Solche

Migrationsstudien liefern indirekte Hinweise darauf, dass exogene Umweltfaktoren in der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind [9, 10].

## **1.2 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms**

### **1.2.1 Ernährungsbedingte Faktoren**

Epidemiologische Studien zeigen auf, dass die Ernährung einerseits einen protektiven und andererseits einen kanzerogenen Einfluss auf das KRK hat [11]. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Konsum von tierischen Fetten sowie Alkohol unabhängige Risikofaktoren für das KRK sind [11, 12]. Es zeigte sich die Erhöhung der Inzidenzrate an KRK durch den starken Verzehr von tierischer fettreicher Ernährung, mit einem hohen Anteil an rotem Fleisch [13, 14]. Die Tumorentstehung kann eine Folge längerer Exposition von Toxinen im distalen Kolon darstellen. Ursache hierfür ist die relativ langsame Passagezeit und das verengte Darmlumen [15]. Dagegen reduzieren eine ballaststoffreiche Ernährung sowie Gemüse und Obst das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [15].

### **1.2.2 Genetische Faktoren**

Das kolorektale Karzinom entsteht aus einer Reihe genetischer Veränderungen, die zu einer progredienten Fehlordnung der normalen Mechanismen, die für die Regulierung des Zellwachstums und der Differenzierung notwendig sind, führen (Multistep-Karzinogenese) [16]. Diese genetischen Veränderungen entstehen durch lokale genetische Mutationen in der Kolonmucosa, meistens sporadisch [17]. Bei bis zu ca. 20% aller Fälle ist eine erbliche Genese nachweisbar [1, 16]. Bei der Bildung von kolorektalen Karzinomen ist die Mutation bei drei gesonderten Genen bekannt: Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Mismatch-Reparaturgene. Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führen zu chromosomalen Instabilitäten bis hin zu 85% der kolorektalen Tumore [16, 18]. Dieser Weg wird als Chromosomeninstabilitäts (CIN-)Pathway bezeichnet. Des Weiteren konnten atypische Veränderungen folgender Signalwege gezeigt werden: Wnt/ Catenin-, K-RAS-RAF/ MAPK-, p53- und TGF- $\beta$ / SMAD-Signalweg. Mutationen in Mismatch-Reparaturgenen (MMR) verursachen dagegen u.a. fehlerhafte DNA-Replikationen im Bereich repetitiver kurzer DNA-Fragmente (Mikrosatelliten). Dieser Weg wird als Mikrosatelliteninstabilitäts-(MIN-)Pathway bezeichnet [16, 17].

Die Reparatur von DNA-Schäden wird durch die mutierten bzw. fehlenden DNA-Reparatur-Proteine gestört [16]. Die Präzision während der DNA-Replikation sowie der

Zellteilung ist für das normale Wachstum und die Proliferation von Zellen von überragender Bedeutung [16]. Normalerweise haben Zellen zahlreiche Mechanismen, die die DNA-Replikation ständig auf Fehler und Schäden kontrollieren und ggf. reparieren [16]. Auf diese Weise wird die Integrität des Genoms gewährleistet und die Anzahl von Mutationen reduziert [16]. Wenn diese Überwachung und der Reparaturmechanismus defekt sind, entstehen kumulativ Mutationen [16]. Anfang der 90er Jahre konnten Mikrosatelliteninstabilität-Repeats im Tumor-DNA bei Patienten mit hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinomen (HNPCC) oder Lynch Syndrom nachgewiesen werden [1, 19]. DNA-Reparatur-Proteine (Mismatch-Reparatur-Proteine) erkennen Fehlpaarungen von Nukleotidbasen und können diese durch den Einsatz von Exonukleasen und Polymerasen gegen korrekte Paarungen aus-tauschen [1]. Bei Patienten mit HNPCC fehlt die DNA-Reparatur-Aktivität [1, 19]. Die Gründe dafür sind Keimbahnmutationen der folgenden bekannten 4 Gene: hPMS2, hMSH6, hMLH1 und hMSH2 [1, 19].

Mutationen des K-RAS Protoonkogens stellen eine bedeutende genetische Veränderung beim kolorektalen Karzinom dar [16, 20]. Die RAS Protoonkogene (N-RAS, H-RAS und K-RAS) kodieren die Produktion von Signalüberträgern, den sogenannten Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen (G-Proteine) [20]. G-Proteine sind für die Signaltransduktion im Rahmen der Zelldifferenzierung verantwortlich. Das Produkt eines mutierten RAS-Gens ist ein abnormes G-Protein, das konstitutiv aktiviert wird und kontinuierlich autonomes Zellwachstum stimuliert [20]. Dadurch werden unterschiedliche RAS-Effektor-Signalwege oder Mediatoren wie RAF/ MAPK, JNK, PI3-K, Cyclin D1, DNA-Methyltransferase und VEGF aktiviert [16, 17]. Für die Tumorentstehung sind zusätzlich zu den RAS-Gen-Mutationen andere molekulare Ereignisse erforderlich [21]. Chromosomale Verluste oder Mutationen im Bereich von Tumorsuppressorgenen führen zu einem unregulierten Wachstum und zu neoplastischen Transformationen [20]. Ein solches Tumorsuppressorgen ist das adenomatöse Polyposis Coli (APC)-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 5 (5q21-q22) [1, 19, 20]. Keimbahnmutationen in diesem Gen führen zur familiären adenomatösen Polyposis (FAP) [1]. Es sind meistens Stop-Codon-Mutationen. Diese resultieren in einem fehlerhaften APC-Protein [1, 19, 20]. Die betroffenen Personen entwickeln bereits in frühen Lebensjahren hunderte bis tausende kolorektale adenomatöse Polypen, aus denen sich im weiteren Verlauf Adenokarzinome entwickeln können [1, 19, 20]. Das lebenslange Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms ist praktisch 100%. Das APC-Gen kodiert für ein großes Protein (2.843 Aminosäuren) mit verschiedenen funktionellen Domänen und ist Bestandteil des Wnt/Catenin-Signalwegs [1, 19, 20]. Eine wesentliche Aufgabe des Proteins besteht darin,  $\beta$ -Catenin zu binden. Es bildet einen Komplex mit Axin und GSK-3 $\beta$ , der dabei eine Ubiquitylierung und den proteasomalen Abbau induziert [1, 19, 20]. Dadurch sinkt die Menge an  $\beta$ -Catenin in der Zelle [1, 19, 20].

Die Mutation des APC-Gens bedeutet einen Funktionsverlust dieser Bindung. Dabei steigt die Menge an freiem  $\beta$ -Catenin intrazellulär an [1, 19, 20]. Dieses verlagert sich in den Zellkern und führt zur Expression weiterer Gene. Dabei wird die Zellwachstumsregulation aktiviert [1, 19, 20]. Mutationen des Proto-Onkogens  $\beta$ -Catenin führen bei intaktem APC-Gen ebenfalls zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin [1, 19, 20]. Das Ergebnis ist eine beschleunigte neoplastische Proliferation der Kolonmucosa und zeigt die besondere Bedeutung des Wnt/Catenin-Signalwegs für die molekulare Pathogenese des kolorektalen Karzinoms [1, 19, 20].

Die überwiegende Mehrheit der KRK haben eine sporadische Genese [17]. Laut epidemiologischen Studien weisen bis zu 20% aller KRK ein autosomal-dominant vererbtes Muster auf [1]. Die beiden am besten beschriebenen hereditären kolorektale Karzinome sind die FAP und HNPCC, welche mit 3-5% den größten Anteil an den hereditären KRK ausmachen [16].

### **1.2.3 Adenom-Karzinom Sequenz**

Die kolorektalen Polypen werden in neoplastische und nicht neoplastische Kategorien unterteilt. Die neoplastischen Polypen sind Adenome und können sich zu Karzinomen entwickeln [22]. Die nicht-neoplastischen Polypen sind für das kolorektale Karzinom keine Präkanzerose und umfassen hyperplastische, entzündliche, juvenile Polypen und hamartomatöse Polypen [22]. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ist bei Patienten mit multiplen Polypen doppelt so hoch, als bei Patienten mit einem einzigen Polyp [22]. Die Hälfte der Polypen befinden sich im distalen Bereich des Kolons und Sigmoid [23]. Histologisch werden die Adenome in tubuläre, tubulovillöse oder zottige Adenome aufgeteilt [22, 23]. Tubuläre Adenome sind die häufigste Art und stellen etwa 75% der neoplastischen Polypen dar [23]. Laut Screeningstudien mittels Koloskopie beträgt die Prävalenz von Polypen bei den 45 bis 50jährigen ca. 10%, bei den 50 bis 75jährigen 15% und bei den über 80jährigen 40% [23]. Bei allen Altersgruppen waren mehr Männer als Frauen betroffen.

### **1.2.4 Weitere Risikofaktoren**

Adipositas, Bewegungsmangel, regelmäßiger Alkohol- sowie Tabakkonsum werden als unabhängige Risikofaktoren für ein kolorektales Karzinom beschrieben [5, 11, 12]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Personen ab der 5. Lebensdekade ein erhöhtes Risiko haben, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Dieses Risiko steigt proportional bis zur achten Lebensdekade an [2].

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, insbesondere Colitis Ulcerosa, erhöhen das Risiko, am KRK zu erkranken. Der Umfang der Kolon-Beteiligung, das Alter bei Beginn, der Schweregrad und die Dauer der Erkrankung sind kritische Faktoren bei der Entstehung eines Adenokarzinoms [24].

### **1.3 Diagnostik, Staging, Therapie und Prognose**

Nach der WHO-Klassifikation sind histologisch 90% bis 95% aller KRK Adenokarzinome [22]. Das muzinöse Adenokarzinom, das Gallertkarzinom, folgt mit 5-10% [22]. Andere Karzinomtypen, das Siegelringzellkarzinom (intrazellulär verschleimend) und das undifferenzierte Karzinom, sind hoch aggressive Raritäten. Ganz selten sind dies kleinzellige Karzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse oder medulläre Karzinome [22]. Die meisten Kolon Adenokarzinome sind mäßig oder gut differenziert. Etwa 20% der Adenokarzinome sind schlecht oder undifferenziert. Diese sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. 10% bis 20% der Tumore werden als muzinöse oder Kolloid-Karzinome auf der Basis der Produktion von Muzin beschrieben[22]. Diese Tumore haben im Vergleich zu den nicht muzinösen Tumoren eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate. Blutgefäßinvasionen, Lymphgefäß Invasionen, und das Fehlen einer lymphozytären Reaktion auf den Tumor sind weitere histologische Merkmale, die mit einer schlechten Prognose einhergehen [25]. Der wichtigste prognostische Faktor beim KRK ist das Vorliegen von Fern- und Lymphknotenmetastasen [25, 26]. Die Stadieneinteilung erfolgt in Europa mehrheitlich nach der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC), die die Tumordinfiltration in Nachbarorgane, das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und das Vorliegen von Fernmetastasen berücksichtigen [25]. Das UICC Stadium schätzt die Prognose des Patienten und dient als Basis für die Indikationsstellung einer stadiengerechten Therapie [25].

UICC	Definition	TNM-System			Dukes
0	Carcinoma in situ	Tis	N0	M0	
I	Ia Tumor infiltriert Mukosa und Submukosa	T1	N0	M0	A
	Ib Tumor infiltriert Muscularis propria	T2	N0	M0	
IIA	Tumor infiltriert durch die Muskularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches Fett oder perirektales Gewebe	T3	N0	M0	B
IIB	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum	T4a	N0	M0	
IIC	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen	T4b	N0	M0	
IIIA	Metastasen in 1 regionärem Lymphknoten	T1,T2	N1a	M0	C
	Metastase in 4 bis 6 regionären Lymphknoten	T1	N2a	M0	
IIIB	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten	T3, T4a	N1	M0	
	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten	T2, T3	N2a	M0	
	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten	T1, T2	N2b	M0	
IIIC	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten	T4a	N2a	M0	
	7 oder mehr Lymphknoten befallen	T3, T4b	N2b	M0	
	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten	T4b	N1,N2	M0	
IVA	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)	Alle T	Alle N	M1a	D
IVB	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum	Alle T	Alle N	M1b	

Tabelle 1: Einteilung von Tumorstadien nach dem TMM-System der Union for International Cancer Control (UICC) 2010 [25]

Bei der Behandlung des KRK gibt es viele verschiedene Strategien, die sich abhängig von der Ausdehnung des Tumors ergeben. Die Staging-Diagnostik setzt sich dabei aus anamnestischen und klinischen Befunden, Laboruntersuchungen, Diagnostik mittels Endoskopie und Sonographie sowie radiologischen Verfahren zusammen. Insbesondere eine ausführliche sorgfältige Familienanamnese hat im Rahmen eines HNPCC eine entscheidende Bedeutung für die Diagnose eines kolorektalen Karzinoms.

Die heutige Behandlung des KRK ist interdisziplinär und multimodal, d. h. die Schwerpunkte liegen in der Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie [25]. Die Therapie ist vom Tumorstadium gemäß der Union for International Cancer Control (UICC) abhängig [25].

Die therapeutische Strategie bei KRK ist eine radikale chirurgisch-onkologische Resektion mit der Entfernung des Lymphabflussgebiets, in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation [25].

Da kolorektale Karzinome zirkulär wachsen und überwiegend in die regionären Lymphknoten metastasieren, wird durch die en-bloc-Entfernung des Tumors mit seinem Lymphabflussgebiet die möglichst zentrale radikuläre Absetzung des zugehörigen Gefäßstiels angestrebt [25]. Bei geringer intramuraler mikroskopischer Ausbreitung beträgt der Sicherheitsabstand des Tumors bei Lymphknotenmetastasen mindestens 10cm beidseits [25]. Der genaue Resektionsumfang wird weitgehend von der Lage, der Gefäßversorgung und der Größe des Tumors bestimmt [25].

Die anschließende, sogenannte adjuvante, chemotherapeutische Behandlung hat sich durch die Zulassung neuer Medikamente mit besserer Verträglichkeit deutlich verbessert [25]. Als Standard wird die adjuvante Chemotherapie bei Patienten im Stadium UICC III mit dem Ziel, die Rezidive zu reduzieren und die krankheitsfreie Überlebensrate bei möglichst geringer Toxizität zu steigern, indiziert [25]. Die Voraussetzung für eine adjuvante Therapie ist die R0-Resektion des Primärtumors sowie der Ausschluss von Fernmetastasen[25]. Die neoadjuvante Radio- oder Radio-Chemotherapie ist bei fortgeschrittenen Tumoren ausschließlich des Rektums in den Stadien T3/4 N0 M0 (UICC II) und T1-4 N1 M0 (UICC III) indiziert [25].

Trotz der Verbesserung in der Diagnostik sowie der multidisziplinären Therapie in der Behandlung von KRK versterben noch immer mehr als die Hälfte der Patienten. Die folgende Tabelle zeigt die 5-Jahres-Überlebensrate mit den jeweiligen UICC Tumorstadien.

<b>Stadien nach UICC</b>	<b>5-Jahres-Überlebensraten in %</b>
I	78-95
II	70-77
III	45
IV	4-5

Tabelle 2: Die UICC stadienabhängige Lebenserwartung nach [25]

Um die krankheitsfreie Überlebensrate zu verlängern, werden weitere neue Wege in der Therapie erforscht. Ein möglicher Weg besteht über den „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor“ (PPAR).

## 1.4 Der „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor“(PPAR)

Der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor zählt zur Familie der Kernrezeptoren (NR) [27, 28]. Die Kernrezeptoren sind intrazelluläre Proteine, die nach Aktivierung durch Liganden in den Zellkern wandern. Diese Rezeptoren wurden in den 1990er Jahren bei Nagern identifiziert und nach ihrer Eigenschaft der Peroxisomenproliferation benannt [27, 28]. PPARs sind einer Unterfamilie der nuklearen-Rezeptoren zugeordnet. Andere Rezeptoren in derselben Klasse sind die Retinsäure Rezeptoren (RAR), die Schilddrüsenhormon-Rezeptoren (TR) und die Steroid-Rezeptoren [27, 28]. PPAR wirkt als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor und ist an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose oder Differenzierung beteiligt. Natürliche Fettsäuren und Fibrate sind bekannte Aktivatoren von PPAR [27, 28]. PPARs regulieren die Expression verschiedener Gene, die für den Lipid-und Glukosestoffwechsel entscheidend sind. Die Regulation vom Stoffwechsel stellt die Hautaufgabe von PPAR dar. Allerdings konnte inzwischen gezeigt werden, dass PPAR weitere Zellfunktionen beeinflussen kann [27, 28].

PPAR wird aus vier funktionellen Domänen aufgebaut: A/B, C, D und E/F. Die NH<sub>2</sub>-terminale Region A/B-Domäne enthält eine Liganden-unabhängige transkriptionelle Aktivierungs-funktion 1, AF-1 [27, 28]. Diese ist verantwortlich für die Phosphorylierung von PPAR. Die DNA-bindende Domäne (DBD) oder C-Domäne besteht aus zwei Zinkfingermotiven und fördert die Bindung von PPAR an das Peroxisom Proliferator Response-Element (PPRE) in der Promotorregion von Zielgenen [27, 28]. Der D-Bereich stellt eine Bindungsstelle für Koaktivatoren oder Korepressoren dar [27, 28]. Der E-Bereich oder die Liganden-bindende Domäne (LBD) ist zuständig für die Ligandenspezifität und Aktivierung von PPAR-Bindung an das PPRE, die die Expression von Zielgenen erhöht [27, 28]. Die Verstärkung durch die PPAR-Kofaktoren zur Unterstützung der Gentranskription wird durch die Liganden-abhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktion 2 durchgeführt (AF-2), die sich in der E/F-Domäne befindet [27, 28]. Der AF-2 Teil besitzt räumlich eine große C- terminale Region [27, 28].

Neben der Aktivierung von PPAR durch natürliche und synthetische Liganden, spielen andere Faktoren wie der Retinoid X Rezeptor (RXR), PPRES, Koaktivatoren und Koepressoren eine entscheidende Rolle für die Erreichung der gewünschten Transkription [27, 28]. Die LBD Domain begünstigt die Heterodimer-Bildung von PPAR mit dem RXR [27, 28]. Das daraus resultierende Heterodimer bindet PPRE nach der Rekrutierung von Koaktivatoren oder Korepressoren [27, 28]. Mehrere Proteine wirken als Koaktivatoren (Aktivierung der Transkription) oder Korepressoren (Hemmung der Transkription) [27, 28].

### 1.4.1 Isoformen von PPAR

Bis heute sind drei Isoformen von PPAR identifiziert worden, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Diese sind PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  /  $\beta$  und PPAR- $\gamma$ . Alle drei PPAR-Isoformen besitzen ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften [27, 28].

PPAR- $\alpha$  dient als Rezeptor für eine strukturell vielfältige Klasse von Verbindungen, einschließlich der Fibrate [27, 28]. Fibrate gehören zu Medikamenten, die bei einer Hyper-lipidämie eingesetzt werden. PPAR- $\alpha$  ist in zahlreichen Geweben von Nagern und Menschen, einschließlich der Leber, der Niere, des Herzens, der Skelettmuskel und im braunen Fettgewebe enthalten [27, 28]. Es findet sich auch in einer Reihe von vaskulären Zellen, wie Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Monozyten/Makrophagen [27, 28]. PPAR- $\alpha$  zeigt einen hypolipidämischen Effekt sowie eine antiinflammatorische Eigenschaft [27, 28].

Trotz langer Forschung über PPAR- $\alpha$  und PPAR- $\gamma$  bleibt die Funktion von PPAR- $\beta$  unklar. PPAR- $\beta$  ist in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert. Die höchste Expression wurde im Gehirn sowie im Fett- und Hautgewebe nachgewiesen [27, 28].

Durch die Phänomene „alternatives Spleißen und alternativer Promoter Start“ sind vier Splice Varianten oder mRNA Isoformen bisher bekannt: PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2, PPAR- $\gamma$ 3 und PPAR- $\gamma$ 4 [29]. PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 und PPAR- $\gamma$ 4 kodieren das gleiche Proteinprodukt [29]. PPAR- $\gamma$ 2 kodiert ein Protein mit einer zusätzlichen N-terminalen Exon, das 30 Aminosäuren enthält. Bisher ist nichts über die PPAR- $\gamma$ 4 Expression bekannt [29]. Die Expression der Splice Varianten ist gewebeabhängig. PPAR- $\gamma$ 1 und PPAR- $\gamma$ 3 findet sich in verschiedenen Geweben einschließlich des Herzens, der Skelettmuskulatur, des Dün- und Dickdarmes, der Niere, des Pankreas und der Milz, während sich PPAR- $\gamma$ 2 auf das Fettgewebe beschränkt [27-29].

### 1.4.2 PPAR- $\gamma$ vermittelte Gentranskription

Der Gen-Transkriptions Mechanismus ist in allen PPAR- $\gamma$ -Splice Varianten identisch [28]. Der Prozess der Transkription beginnt mit der Bindung von Liganden (endogene oder exogene) an den PPAR- $\gamma$ -Rezeptor [28]. Der ligandengebundene PPAR bildet ein Heterodimer mit RXR [28, 29]. Dieser Heterodimer bindet sich an die Promotor-Region des PPRE, nachdem die Koaktivatoren oder die Korepressoren angedockt haben [28, 29]. Daraus resultiert entweder eine Zunahme oder Abnahme der Transkription-Aktivitäten verschiedener Gene in den verschiedenen beteiligten biologischen Prozessen. Adipogenese, Glukose-Homöostase und Fettstoffwechsel sind die wichtigsten Mechanismen der PPAR- $\gamma$  [28, 29].

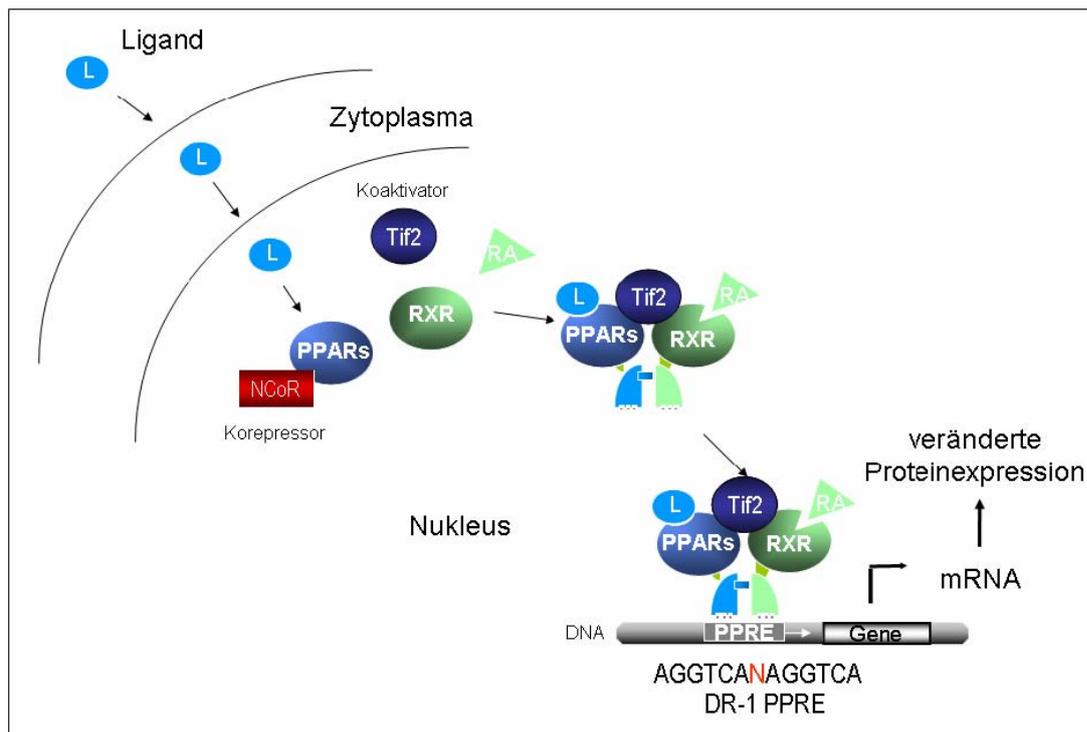


Abbildung 1: Eine mögliche Signalkaskade nach Ligandenaktivierung von PPAR- $\gamma$  nach [30]

### 1.4.3 PPAR- $\gamma$ Liganden

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure sind endogene Liganden von PPAR- $\gamma$  [27, 28]. Prostaglandin (PG)-Verbindungen wie 15-deoxy-delta12-14-PGJ2 (15d-PGJ2) wurden als ein PPAR- $\gamma$ -Agonist mit unterschiedlichen Besonderheiten identifiziert [27, 28]. Es konnte aufgezeigt werden, dass oxidierte Lipide wie 9-HODE, 13-HODE und 15-HETE in primären humanen Trophoblasten PPAR- $\gamma$  aktivieren können [27, 28].

Thiazolidinedione (TZD) sind die wichtigsten synthetischen PPAR- $\gamma$  selektiven Liganden. Sie werden als orale Anti-Diabetika eingesetzt [27, 28]. Die meisten TZD's (Troglitazon, Ciglitazon, Pioglitazon und Englitazone) sind PPAR- $\gamma$  selektiv und zeigen eine verminderte Aktivität gegenüber PPAR- $\alpha$  oder PPAR- $\beta$  [27, 28].

Neuartige PPAR- $\gamma$  partielle Agonisten und Antagonisten wurden kürzlich identifiziert [27, 28]. Das synthetische Triterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-säure (CDDO) ist ein partieller Agonist mit entzündungshemmenden Eigenschaften [27, 28]. Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) und LG-100641 sind vor kurzem als PPAR- $\gamma$ -Antagonisten identifiziert worden [27, 28]. GW9662 ist ein weiterer Antagonist des PPAR- $\gamma$  und wirkt stärker als andere bisher bekannten Antagonisten [31]. Aus diesem Grund wird GW9662 in dieser Übersichtsarbeit verwendet. Obwohl diese Verbindungen weniger an

klinischer Bedeutung haben, können sie zum weiteren Verständnis der PPAR- $\gamma$  Physiologie und der Identifizierung neuer Liganden nützlich sein. Neben chemisch-synthetischen Methoden, konnte die Forschung in natürlichen Produkten ebenfalls potente PPAR- $\gamma$ -Agonisten in mehreren Heilpflanzen identifizieren [28]. Resultate hierbei waren z.B. Saurufuran A von *Saururus chinensis* (Saururaceae), Flavonoide wie Chrysin, Apigenin, Kampferol und Phenolverbindungen aus *Glycyrrhiza uralensis* (Fabaceae) [28].

#### **1.4.4 Antikanzerogene und antiproliferative Mechanismen von PPAR- $\gamma$ Liganden**

Verschiedene experimentelle Arbeiten ergaben, dass PPAR- $\gamma$  Agonisten die wachstumshemmende Wirkung mit Zellzyklusarrest, Apoptose und nicht apoptotischer Zelltod sowohl von diversen Karzinomzellen als auch Stromazellen induzieren [31]. Liganden aktivierten PPAR- $\gamma$  fungiert als Kerntranskriptionsfaktor [31]. Allerdings bleiben die spezifischen Gene, die letztendlich die antikanzerogene und antiproliferative Wirkung induzieren, dabei noch unklar [31]. In vitro Studien zeigen abhängige und unabhängige Mechanismen der Kerntranskriptionsaktivierung [31]. Rosiglitazon induziert eine transkriptionelle Hochregulation von dem Tumorsuppressorgen PTEN (Phosphatase und Tensin homolog), die die PI3 Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) inhibitiert. Dies führt in Makrophagen, Caco2 Kolonkarzinomzelllinien und MCF-7 Mammakarzinomzellen zur Wachstumshemmung [31]. Sowohl Rosiglitazon als auch GW7845 konnten eine Hochregulation von verschiedenen Differentiation-Marker wie TSC22 (Transforming growth factor simulated clone-22, L-FABP(Liver-fatty acid-binding protein), RegIA (regenerating gene), Gob-4, CEA (Carcinoembryonic antigen) und NGAL (Neutrophilgelatinase-associated lipocalin) in Kolonkarzinomzellen induzieren [31]. Diese Hochregulation konnte durch den PPAR- $\gamma$  Antagonist GW9662 gehemmt werden und daraus resultiert, wie die PPAR- $\gamma$  Aktivierung mit der Wachstumshemmung verknüpft ist [31]. Andere Arbeitsgruppen zeigten unter PPAR- $\gamma$  Liganden in MCF-7 Mammakarzinomzellen ebenfalls eine Hochregulation von Tumor-suppressorgen BRCA1 auf [31]. Bei Studien mit C6 Gliomzellen wurde eine Hochregulation der pro-apoptotische Proteine BAX und BAD beschrieben [31]. Durch die Hochregulation von BAX und BAD wurde die Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Aktivierung mehrere Effektor-Caspasen beobachtet [31]. Des Weiteren wurde in menschlichen malignen Astrozytomzellen und Leberzellen eine erhöhte Caspase-3 Aktivität durch PPAR- $\gamma$  Aktivierung beschrieben [31]. Andere Arbeiten zeigten, wie die Apoptose unter PPAR- $\gamma$  Einwirkung nach einer Blockade der Caspasen stattfand [31]. Bei humanen Leberkarzinom- und Schilddrüsenkarzinomzellen konnte keine Erhöhung der BAX Proteine unter Behandlung mit Glitazonen gezeigt werden [31]. Dies deutet drauf hin, dass mehrere alternative apoptotische Signalwege als Antwort auf PPAR- $\gamma$  Aktivierung zum

Zelltod führen können [31]. Studien mit PPAR- $\gamma$  negativen Zellen oder vorbehandelten Zellen mit PPAR- $\gamma$  Antagonisten zeigten trotz Ligandenbindung unabhängige Mechanismen [31]. Diese Effekte konnten in Mammakarzinomzellen unter Behandlung mittels 15-deoxy-delta12-14-PGJ2 (15d-PGJ2) gezeigt werden [31]. Troglitazon unterdrückt das Zellwachstum von PPAR- $\gamma$  negativen Leukämiezellen KU812 [31]. Troglitazon induziert ebenfalls den CDK-Inhibitor p21<sup>Cip/WAF1</sup> (Cyclin-Dependent Kinase) [31]. Dies führt zu Wachstumshemmungen in Leukämiezellen [31]. Eine ERK 1/2- Aktivierung (Extracellular Signal regulated Kinase) durch Troglitazon induziert den CDK-Inhibitor p21<sup>Cip/WAF1</sup> auch in Kolonkarzinomzellen [31].

Ein Target von PPAR- $\gamma$  sind Cyclin-abhängige Kinase (CDK) Inhibitoren, wie z. B. p18 oder p21 [31]. CDK Inhibitoren hemmen die Progression des Zellzyklus durch die Inaktivierung der Bildung von Cyclin/ CDK-Komplexe, die ausschlaggebend für die Phosphorylierung von Retinoblastomprotein nach der Komplexbildung mit E2F sind [31]. Die Hochregulation der CDK Inhibitoren durch PPAR- $\gamma$  Aktivierung blockiert den Zellzyklus [31]. Ein weiterer Mechanismus entsteht durch Cyclin D1 [31]. PPAR- $\gamma$  Agonisten begünstigen den Zellzyklusarrest durch die Herunterregulation von Cyclin D1 in verschiedenen Tumorzellenlinien [31].

<b>Gewebe</b>	<b>Zelllinie</b>	<b>PPAR-<math>\gamma</math> Agonist</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Referenz</b>
<b>Magenkarzinom</b>	MKN-7, MKN-28, MKN-45, AGS	Troglitazon, Prostaglandin J <sub>2</sub>	Wachstumstillstand	[32]
	MKN-45	Troglitazon, Pioglitazon, Prostaglandin J <sub>2</sub>	Hemmung des Zellwachstums, Apoptose	[33]
<b>Kolorektales Karzinom</b>	HT-29	Prostaglandin J <sub>2</sub> , Troglitazon	Zellwachstum Arrest, Apoptose	[34]
	HT-29, CaCo-2, SW-480, DLD-1, LoVo, T-84	Troglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon	Wachstumstillstand, Zelldifferenzierung	[35]
	Moser, HCT116, 188, DLD1, DLD2, CX-1	Troglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon	Wachstumstillstand, Zelldifferenzierung	[36]
	C57BL/6J-ApcMin mice	Troglitazon	Erhöhte Polypenneigung	[37]
	C57BL/6J-ApcMin mice (anfällig für Kolonneoplasie)	Troglitazon, Rosiglitazon	Zunahme der Häufigkeit und Größe der Tumoren	[38]
<b>Pankreaskarzinom</b>	AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, HPAF-II, MIA PaCa- 2, PANC-1	Prostaglandin J <sub>2</sub> , Ciglitazon	Verringerte Zellzahl und Viabilität	[39]
	Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, MIAPaCa-2	Thiazolidinedione (nicht spezifiziert)	Wachstumshemmung, Zellzyklusarrest in G1, Zelldifferenzierung	[40]
	PK-1, PK-8, PK-9, MIAPaCa-2	Troglitazon	Zellzyklusarrest in G1, Wachstumsverzögerung	[41]
<b>Hepatozelluläreskarzinom</b>	PLC/PRF/5, Hep G2, HuH-7	Troglitazon	Apoptose	[42]
	HLF, HAK-1A, HAK-1B, HAK 5	Troglitazon	Wachstumstillstand, Zellzyklusarrest in G0/1	[43]
	Hep G2, HuH-7, KYN-1, KYN-2	Troglitazon, Rosiglitazon, Prostaglandin J <sub>2</sub>	Wachstumstillstand, Zellzyklusarrest	[44]

Tabelle 3: Eine Zusammenfassung von ausgewählten In vitro-Studien zur antineoplastischen Wirkung von PPAR- $\gamma$  Agonisten nach [45].

#### **1.4.5 Effekte von PPAR- $\gamma$ Agonisten beim kolorektalen Karzinom**

PPAR- $\gamma_1$  wird reichlich im Kolonepithel, vor allem mehr im Lumen als in der Krypta der differenzierten Epithelzellen, exprimiert [27-29]. Dies wurde anhand von Versuchen mit mehreren verschiedenen menschlichen Kolonkarzinom-Zelllinien sowie Proben aus Biopsien von Patienten bestätigt. Die Proliferation und Differenzierung, ebenso wie der Wachstumsstillstand, wurde auch bei Kolonkarzinom-Zelllinien mit der Behandlung der PPAR- $\gamma$  Agonisten beobachtet. Der stärkste Beweis kommt aus der Analyse der menschlichen Kolonkarzinom-Zelllinien, von denen einige das Wachstum durch Thiazolidinedione in Kultur und vivo hemmten [34, 35, 46-50]. Verschiedene Studien zeigen, wie PPAR frühzeitig die Kolonkarzinogenese in Tiermodellen unterdrückt [51-54].

#### **1.4.6 Effekte von Telmisartan auf die Regulation von PPAR- $\gamma$**

Telmisartan ist ein klinisch zugelassener Angiotensin-II-Rezeptorblocker (ARB) mit effektiver Wirksamkeit zur Blutdrucksenkung [55]. Es zeigen sich strukturelle Ähnlichkeiten mit dem PPAR- $\gamma$ -Liganden Pioglitazon auf [55, 56]. Ein Angiotensin-II-Rezeptorblocker (ARB) blockiert die Bindung von Angiotensin II an den Typ-1-Rezeptor [56]. Diese Substanz wird häufig für die Behandlung von Bluthochdruck und die Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt [55]. Mittels zellulärer PPAR- $\gamma$  Transaktivierungstests wurde festgestellt, dass mit Telmisartan eine signifikante Aktivierung von PPAR- $\gamma$  bei Konzentrationen im Plasma für dieselben Dosierungen bei der Behandlung von essentieller Hypertonie erreicht werden kann [55]. Im Gegensatz dazu zeigten Losartan, Eprosartan, Candesartan, Valsartan, Olmesartan und Irbesartan in gleicher Konzentration ein geringeres Potential, PPAR- $\gamma$  zu aktivieren [56]. Die Daten legen somit für Telmisartan eine Rolle als selektiver partieller Agonist von PPAR- $\gamma$  nahe [56].

#### **1.4.7 Das systemische Renin-Angiotensin-System (RAS)**

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) gehört zu den wichtigsten endogenen Steuerungssystemen des Blutdruckes, des Elektrolythaushaltes und der Volumenregulation [57]. Diese Volumenregulation wird primär durch die Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation peripherer Gefäße und die Freisetzung von Aldosteron in die Nebenniere gesteuert [57]. Mehr als ein Jahrhundert nach dieser Entdeckung erweiterte sich die physiologische Auswirkung des RAS mit der Identifizierung von neuen molekularen Komponenten, Funktionen und Subsystemen [57]. Die Forschungsfortschritte, besonders in den letzten

Jahrzenten, haben zu einem besseren Verständnis und einer positiveren Behandlung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen geführt [57]. Ursprünglich bestand das RAS aus einem einzigen biologisch-aktiven Hormon Angiotensin II, das durch eine Reihe enzymatischer Aktivitäten generiert wurde. In der Kaskade wird zuerst Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet [57]. Die Bioprotease Renin spaltet anschließend das Vorläuferpeptid Angiotensinogen, das in der Leber produziert wird und im Blutplasma zirkuliert [57]. Das Produkt ist dann das biologisch-inaktive Angiotensin I, ein Decapeptid [57]. Mittels der membranständigen, von Endothelzellen der Lunge synthetisierte Carboxydipeptidase Angiotensin Converting Enzyme (ACE), wird Angiotensin I zum Angiotensin II umgewandelt [57]. Das Angiotensin II ist ein biologisch-aktives Oktapeptid und wirkt überwiegend an zwei gut charakterisierten G-Protein gekoppelten Plasmamembran Rezeptoren, dem Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 (AT1R) und Angiotensin II Rezeptor Subtyp 2 (AT2R) [57]. Die meisten pathophysiologisch relevanten Effekte werden durch AT1R vermittelt [57]. Einer der bedeutendsten Fortschritte in den vergangenen zwei Jahrzehnten war die Entdeckung des Lokalen oder Gewebe RAS [58].

#### **1.4.8 Das Lokale Angiotensin II System**

Verschiedene Versuchsergebnisse zeigen, dass das Angiotensin II nicht nur systematisch durch die enzymatische Aktivität von Renin und ACE, sondern auch lokal in zahlreichen Organen einschließlich der Niere, der Gefäße, des Herzens, der Nebenniere, der Augen, der Hoden und des Gehirns produziert wird [58]. Durch die Verwendung von molekularbiologischen Methoden und Transgenen bzw. Knock-out-Modellen hat sich diese Erkenntnis über mögliche lokale Angiotensin II Systeme durchgesetzt [58]. Diese lokalen Systeme sind unabhängig von dem systematischen RAS, allerdings ist eine Interaktion der Systeme möglich [58]. Komponente des systemischen RAS können lokal im Organ gespeichert und für die lokale Angiotensin II Synthese zur Verfügung gestellt werden [58]. Ein lokales System ist durch die Anwesenheit von RAS-Komponente, Angiotensinogen, Umwandlungsenzymen, lokaler Synthese von Angiotensin II und die Bindung an spezifische Rezeptoren für die gewünschte physiologische Einwirkung gekennzeichnet [58]. Verschiedene Funktionen werden dem lokalen Angiotensin II System zugeschrieben: das Zellwachstum bzw. die Proliferation im Herzgewebe, die Blutdruckregulation, die Stimulation der Nahrungs- und Wasseraufnahme durch das Gehirn, die Hormonsekretion in der Bauchspeicheldrüse, die Induktion von Zellwachstum bzw. Apoptose, die Stimulation der Kollagenbildung und die Steuerung von Angiogenese [58]. Angiotensin II ist bei der Immunantwort und Inflammation durch die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen beteiligt [58].

## 1.5 Fragestellung und Hypothese

Im Kolon werden sowohl PPAR- $\gamma$  als auch Angiotensin II Rezeptoren in der menschlichen Darmschleimhaut, im Kolonkarzinom und in kultivierten Kolonkarzinom-Zellen exprimiert [59]. Wie bereits detailliert beschrieben, führt eine Aktivierung von PPAR- $\gamma$  zu einer Inhibition des Zellwachstums und Induktion des Zellzyklusarrestes in Kolonkarzinomzellen [60, 61]. Es unterstützt daher die Rolle von PPAR- $\gamma$  als potenziellen Tumorsuppressor.

PPAR- $\gamma$  kann durch seine natürlichen Liganden aktiviert werden. Darüber hinaus deuten aktuelle präklinische Studien darauf hin, dass der aus der Behandlung der arteriellen Hypertonie bekannte Angiotensin-II-Rezeptorblocker Telmisartan als selektiver partieller PPAR- $\gamma$  Agonist geeignet ist.

### Fragestellung

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden experimentellen Arbeit untersucht werden:

1. Ist für den Angiotensin-II-Rezeptorblocker Telmisartan ein Einfluss auf die Proliferation und Apoptose von humanen Kolon-karzinomzelllinien über eine PPAR- $\gamma$  Aktivierung nachweisbar?
2. Wie unterscheiden sich die Proliferationshemmung, die Reduktion der Zellviabilität und die Induktion der Apoptose in humanen Kolonkarzinomzelllinien nach Inkubation von Telmisartan vs. Pioglitazon?
3. Führt die Behandlung mit Pioglitazon und Telmisartan zu einer Änderung der mRNA Expression der Zielgene PPAR- $\gamma$  und AGTR1?

### Hypothese

Eine partielle PPAR- $\gamma$ -Aktivierung durch den Angiotensin-II Typ1 Rezeptorantagonisten Telmisartan führt in vitro in humanen Kolonkarzinomzellen zu einer Inhibition der Zellproliferation, einer Reduktion der Zellviabilität und einer Induktion der Apoptose.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien wurden in dieser Arbeit verwendet:

0,5ml, 1,5ml und 2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1000µl, 200µl, 20µl und 10µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
1000µl, 200µl, 20µl und 10µl Pipettenspitzen: Biosphere® Filterspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml, 50 ml Röhren: Polypropylene Conical Tube, BLUE MAX™ Jr	BD Biosciences, Heidelberg
Analysenwaage: BP 210S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav: Varioklav®	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Eismaschine: Automatic Ice Machine AF10	Scotsman Ice Systems, Italien
Elektronische Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
ELISA Platten Reader für MTT: EL808, Ultra Microplate Reader und KC4 Software	Bio-Tek Instruments, USA
Feinwaage: BP 310S	Sartorius AG, Göttingen
Fluorescence Microplate Reader für Caspase 3/7 Assay: Spectra Max Gemini™ EM	Molecular Devices, USA
Glaskapillaren für Real-Time PCR: LightCycler® Capillaries 20µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Kühlzentrifuge: Centrifuge Biofuge Primo R	Heraeus, Hanau
Manuelle Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Microtest 96-Well-Zellkulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg
Mikrobiologische Lichtmikroskop: Axioskop 2	Karl-Zeiss, Oberkochen

Mikrozentrifuge: Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge: Minispin plus	Eppendorf, Hamburg
Multikanalpipette: Transferpette®-8, 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Multistep-Pipette: Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg
Multitest 6-Well-Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Neubauer Zählkammer und Deckglas	Marienfeld Superior, Lauda-Königshöfen
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich Laborglaswaren, Bamberg
PCR Instrument: Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Photometer: BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Polysterol- Röhrchen (5ml Round Bottom)	BD Biosciences, Heidelberg
Polystyrene Pipetten (5 ml , 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Real-Time PCR-System: LightCycler® 2.0 Instrument und Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Steril Sicherheitswerkbänke: Captair Filtair Werkbank	Erlab, Köln
Steril Sicherheitswerkbänke: CleanAir Werkbank	Clean Air Techniek, Niederlande
Steril Sicherheitswerkbänke: Gelaire Laminar Flow Werkbank	Australien
Steril Sicherheitswerkbänke: Mikrobiologische HERA Safe	Heraeus, Hanau
Stickstoffbehälter: B2048 Serie M	Cryo Diffusion, Frankreich
Stickstoffbehälter: CryoSystem 2000	MVE Inc., USA
Thermomixer: Thermomixer Comfort 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -80°C: Forma 700 Series	Thermo Scientific, USA
Tiefkühlschrank -80°C: HERA Freeze	Heraeus, Hanau
Vortexer: Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., USA

Wasserbad: Grant	VWR International, Darmstadt
Zellkulturbrutschrank: Heraeus Incubator	Heraeus, Hanau
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkultur-Lichtmikroskop: Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge: Centrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Unter Verwendung folgende Chemikalien und Lösungen wurde gearbeitet:

5X RT Buffer	Thermo Scientific/ Fermentas, USA
Bovines Serumalbumin (FBS)	PAA Laboratories, Cölbe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), High Glucose 4,5g/L	Biochrom AG, Berlin
Ethanol 100 Vol % (MEK)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Ethanol 96 Vol %	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
GW 9662	Alexis Biochemicals, Schweiz/ Biozol Diagnostica, Eching
L-Glutamin, Gibco®	Life Technologies, Darmstadt
Moloney Murine Leukämievirus- (M-MLV-) Reverse Transkriptase plus Buffer	Promega, Mannheim
Mycokill AB	PAA Laboratories, Cölbe
Oligo DT Primer	Promega, Mannheim
PCR Nucleotide Mix (dNTPs)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin

Phosphate-Buffered-Saline (PBS) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories, Cölbe
Pioglitazon	Zhejiang Huahai Pharmaceutical, China
RNasin <sup>®</sup> plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	PAA Laboratories, Cölbe
Sodiumdodecylsulfat, SDS	Roth, Karlsruhe
Telmisartan	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Thiazolylblau)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau (0,5%)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin/ PAA Laboratories, Cölbe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt/ Sigma-Aldrich, Steinheim

Alle zu untersuchten Substanzen wurden mit Dimethylsulfoxid, DMSO nach Protokoll gelöst und diese Stammlösungen bei 4°C aufbewahrt. Für die Dosisverlaufexperimente wurden die Stammlösungen mit Medium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt und eingesetzt.

#### **2.1.2.1 Bestimmung der optimalen Inkubationskonzentration unter der Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO**

Alle Testsubstanzen in dieser Arbeit wurden in Dimethylsulfoxid, DMSO, einem bekannten und häufig eingesetzten Lösungsmittel, gelöst und verdünnt. Um die Fragestellung zu klären, welche DMSO Endkonzentration für die Versuche geeignet ist, wurde DMSO in den Konzentrationen 0,05 %, 0,10 %, 0,20 %, 0,50 % und 1,00 % zu den HT 29- und SW 620-Zellen zugegeben. Nach 3-tägiger Kultivierung im Brutschrank bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub> –Gehalt von 5 % erfolgte die Bestimmung der optimalen Inkubationskonzentration mittels MTT-Test. Zur Auswertung der gemessenen Werte (Absorption bei 550 nm) wurde der Wert der lebenden DMSO freien (nur in Medium) inkubierten Zellen als 100 % gesetzt und die weiteren gemessenen Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Abbildung 2 fasst diese Ergebnisse zusammen.

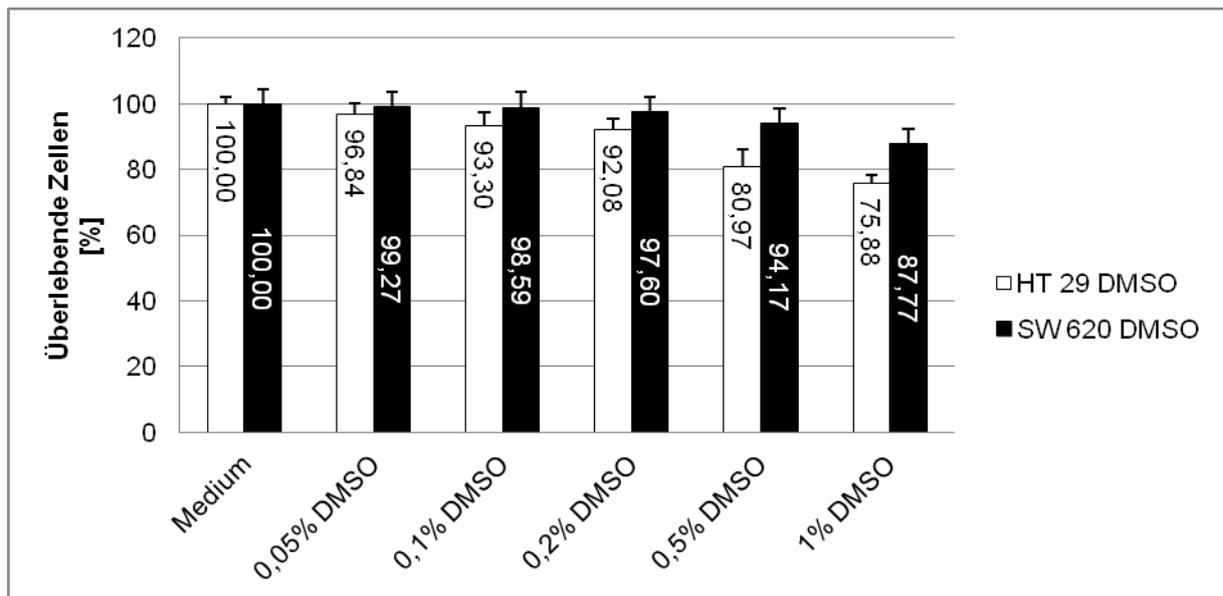


Abbildung 2: Bestimmung der optimalen Inkubationszeit unter der Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO in verschiedener Konzentration. Dargestellt ist ein repräsentatives signifikantes MTT-Test Ergebnis von überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolllösung, Medium ( $p < 0,05$ ) in Prozent.

Die aufgestellte DMSO-Konzentrationsreihe zeigt, dass eine ansteigende DMSO-Konzentration zytotoxisch wirkt und dementsprechend einen Einfluss auf die Proliferation der Zelllinien nimmt. Bei einer Konzentration von weniger als 0,05 % DMSO werden die Reinsubstanzen Pioglitazon und Telmisartan jedoch nahezu nicht gelöst, so dass eine DMSO-Konzentration von 0,05 % mit einer maximalen Proliferationshemmung von unter 5% für die weiteren Analysen verwendet wurde.

### 2.1.2.2 Bestimmung der optimalen Konzentration des PPAR- $\gamma$ mit GW9662

In den Experimenten zur Untersuchung des PPAR- $\gamma$  unabhängigen antiproliferativen Effekts ist die Anwendung des Inhibitors GW9662 essentiell. GW9662 ist ein synthetischer irreversibler PPAR- $\gamma$  Antagonist, der sich an die LBD bindet. Diese Bindung verhindert sowohl die Bindung der natürlichen als auch synthetischen Liganden an die LBD.

Für die Bestimmung der optimalen Konzentration von GW9662 für die Blockade von PPAR- $\gamma$  wurde GW9662 in den Konzentrationen 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zu den HT 29- und SW 620-Zellen zugegeben. Eine Vorinkubation für eine Stunde mit den jeweiligen GW9662 Konzentrationen war notwendig, um eine optimale Blockade von PPAR- $\gamma$  zu erreichen. Pioglitazon wurde als Vollagonist des PPAR- $\gamma$  Rezeptors eingesetzt. Nach 3-tägiger Kultivierung mit Pioglitazon im Brutschrank bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem

CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %, erfolgte die Analyse mittels MTT-Test. Die Messwerte (Absorption bei 550nm) aus den DMSO freien Zellansätzen (nur in Medium) wurden gleich 100 % gesetzt. Die Messwerte der Testreihen wurden in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Abbildung 3 stellt diese Ergebnisse zusammen dar.

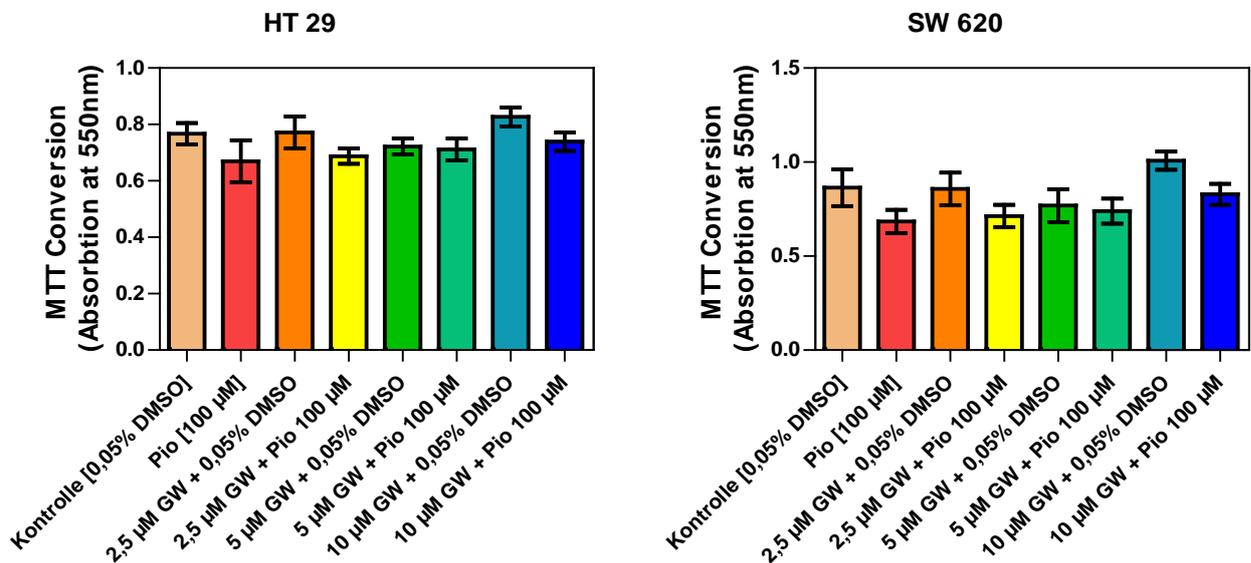


Abbildung 3: HT 29 und SW 620 wurden 72 Stunden mit oder ohne 100µmol/L Pioglitazon als voller PPAR-γ Agonist, sowie in Abwesenheit des selektiven PPAR-γ Antagonist GW9662 in den Konzentrationen 2,5 µmol/L, 5 µmol/L und 10 µmol/L inkubiert. Die überlebende Zellpopulation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Gezeigt ist ein signifikantes Ergebnis der Mittelwerte aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

Die aufgestellte GW9662-Konzentrationsreihe zeigt, wie der antiproliferative Effekt von Pioglitazon durch die Inkubation der Zellen mit 2,5 µM GW9662 aufgehoben werden kann. Im Gegensatz zeigte sich eindeutig, wie höhere GW9662-Konzentrationen proliferativ wirkten (mit Werten höher als bei den Kontrollzellen). Die niedrige Konzentration von 2,5 µM wurde angestrebt, da in beiden Zelllinien die Proliferation überlebender Zellen im Bereich der Kontrollzellen lag.

### 2.1.3 Kits

Folgende Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
SensoLyte® Homogenous AFC Caspase-3/7 Assay Kit	AnaSpec, USA
Taq PCR Core Kit und QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden

#### 2.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden drei Zelllinien von Zellbanken der American Type Culture Collection (ATCC) bzw. European Collection of Cell Culture (ECACC) verwendet. HT 29 entspricht einem gut differenzierten Tumor. Diese adhärenzte Zelllinie wurde 1964 aus dem Kolon einer 44-jährigen Patientin isoliert und histologisch als ein Adenokarzinom identifiziert. SW 480 ist eine weitere adhärenzte Zelllinie und aus dem Kolon eines 50-jährigen Patienten mit einem Adenokarzinom im Stadium B nach Duke [62]. SW 620 entspricht einer adhärenzten Metastasen Zelllinie und wurde aus einem Lymphknoten desselben Patienten wie SW 480 isoliert [62].

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Kolonkarzinomzelllinien

Alle Arbeitsvorgänge erfolgten unter einer sterilen Arbeitsbank und unter sterilen Bedingungen (mit sterilen Lösungen und sterilem Arbeitsmaterial). Die Zellen wurden in einem Brutapparat bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit durch Wasserdampf inkubiert. Die Zellkulturen wurden regelmäßig und routinemäßig (möglichst täglich) sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht. Dabei wurde die Zellmorphologie, Zelldichte und das Vorhandensein von Verunreinigungen wie Pilze und Bakterien kontrolliert. Ferner wurden Farbveränderungen und Anzeichen für einen Infekt des Mediums makroskopisch überwacht. Die Häufigkeit des Mediumwechsels wurde abhängig von der Wachstumsrate der Kultur festgelegt. Da die Zelllinien eine schnelle Zuwachsrates aufwiesen, erfolgte der Mediumwechsel in Abstand von 2 bis 3 Tage. Das Nährmedium bestand aus:

- i) P/S: Penicillin und Streptomycin, 5 ml auf 500 ml Medium. P/S wird bei -20° gelagert. Vor Verwendung wird das Antibiotikum auf Raumtemperatur angewärmt.
- ii) FBS: Fetal Bovine Serum, 50 ml auf 500 ml. Vor Verwendung wird ebenfalls 40 Minuten lang bei 60° erwärmt.
- iii) 500 ml DMEM mit stabilen Glutaminen für alle Zelllinien HT 29/ SW 620/ SW 480.

Alle 3 Komponenten wurden gemischt und der Behälter wird mit dem Herstellungsdatum, der Menge des FBS in Prozent (10%) plus P/S und des Namens des Vorbereiters gekennzeichnet.

Wenn die gesamte Fläche einer Zellkulturflasche besetzt (Konfluenz von über 90%) war, dann konnte eine Subkultur (Passage oder Splitting) gemacht werden, mit dem Ziel, gesundes Wachstum der Zellen zu erhalten. Dieser Prozess reduzierte die Zelldichte auf eine Ebene, in der die Zellen optimal wieder wachsen konnten und das Medium erschöpfte sich nicht zu schnell. Beim Passagieren wurde der Einsatz von Proteinasen wie Trypsin benutzt.

#### **2.2.1.1 Passagieren adhärent wachsender Zellen**

Zum Passagieren der Zellen wurde zuerst das verbrauchte Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend mit ca. 25 ml kalziumfreier Salzlösung PBS einmalig gespült. Zum Ablösen der Zellen von Kulturflaschenboden wurden 3 ml Trypsin nach dem Absaugen des PBS zugegeben. Nach mehrmaligem Schwenken wurden die Zellen daraufhin maximal 5 Minuten bei 37° C bebrütet, bis sich die Zellen ablösten (die Zellen können durch leichtes, mit der Flasche auf die Hand klopfen, ganz gelöst werden). Die Proteinasewirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 7 ml Medium beendet (der im fötalen Kälberserum enthaltene Inhibitor stoppt die Aktivität des Trypsins). Die Zellen wurden dann suspendiert und die Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in der Folge 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Zur Anzucht einer weiteren Zellkultur wurde das durch Zentrifugation entstandene Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. 1 ml davon (Verdünnung 1:10) wurden in die neue Kulturflasche mit 24 ml Medium eingefüllt. Alte Kulturflaschen und gebrauchte Pipetten wurden in den autoklavier-Sack entsorgt.

#### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Bei sehr tiefen Temperaturen (-80 °C bis -196 °C) kann man Zellen längere Zeit (Monate bis Jahrzehnte) lagern. Vor dem Einfrieren wurden dem Medium Zusätze (Dimethylsulfoxid = DMSO) beigemischt, welche die Zerstörung der Zellmembranen durch Eiskristalle verhindern sollten. Einerseits ist langsames Einfrieren und Auftauen grundsätzlich vermutlich schonender, andererseits werden die Zellen, solange das Medium flüssig ist, durch die Zusätze (DMSO) geschädigt.

Zum Einfrieren wurden die kurz vor der Konfluenz stehenden Zellen 3 ml trypsiniert, anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml konischen Zentrifugenröhrchen

überführt und dann 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Auf das durch Zentrifugation entstehende Pellet wurde mit 3 ml Freezing Mix (1 ml DMSO, 2 ml FCS bzw. FBS und 2 ml RPMI 1640 Medium) resuspendiert und danach 10 Minuten aufs Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde in sterile Einfrierröhrchen überführt. Das Einfrieren der Röhrchen erfolgte in einem speziellen Einfrierbehältnis, das das langsame kontinuierliche Abkühlen der Zellen bis  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht gewährleistete. Die langfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte anschließend bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und maximal 2 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erwärmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Medium wurde die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach Anwachsen der ersten Zellen nach 24 Stunden.

## **2.2.2 Zellvitalität und Zellproliferation**

### **2.2.2.1 MTT-Assay**

Der MTT Assay wird zur Bestimmung des Zellwachstums bei Einwirkung unterschiedlicher Substanzen verwendet. Bei dem Test wird als Parameter für den Zellwachstum die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase gemessen, wobei das eingesetzte gelbe Tetrazoliumsalz (MTT) durch die Succinatdehydrogenase in wasserunlösliche violette Formazan-Kristalle metabolisiert wird. Mit dem ELISA-Reader kann die Aktivität quantitativ (Extinktion bei 550nm) bestimmt werden. Die gemessene Intensität des gebildeten Farbstoffes ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen, d.h. je höher die Aktivität, desto besser ist der Zustand der Zellen und desto höher ist die Absorption.

Die Zellen wurden nach Protokoll trypsinisiert und in einer Konzentration von  $3 \times 10^3$  Zellen in einem Volumen von 0.3 ml in die Vertiefungen einer 96-er Mikrotiterplatte pipettiert, wobei die Randvertiefungen frei blieben. Es wurden 3 Reihen a 9 Vertiefungen angelegt. Die Platte wurde ca. 24 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch Kippen der Mikrotiterplatten, mit leichtem Schwung, wurde das Kulturmedium entfernt. Von der zu testenden Substanz in einer Endkonzentration wurden 0,2 ml pro Vertiefung zugegeben (für jede Verdünnung eine Reihe). Als Negativkontrolle diente der Zusatz von Kulturmedium plus DMSO (1. Reihe). Die Zellen wurden für weitere 3 Tage kultiviert. Durch Kippen der Mikrotiterplatten und leichtes Klopfen wurde das Kulturmedium entfernt. Pro Vertiefung pipettierte man 100  $\mu\text{l}$  Medium und 10  $\mu\text{l}$  der MTT -Lösung (50 mg/10 ml PBS) und brütete die Zellen für weitere 4 Stunden im Brutschrank. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  SDS (10%: 5 g/ 50 ml dd Wasser) lysiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion gemessen.

Alle drei Zelllinien wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Pioglitazon und Telmisartan behandelt. Mit Hilfe des MTT-Tests konnte untersucht werden, ob die Zellviabilität der Zelllinien HT 29, SW 480 und SW 620 durch die Behandlung mit Pioglitazon und Telmisartan gehemmt werden kann. Die Messungen erfolgten nach 72 Stunden Inkubation nach Protokoll. Um auszuschließen, dass die auftretende Wachstumshemmung durch das Lösungsmittel bedingt ist, wurde DMSO als Kontrollgruppe mitgeführt. Diese unbehandelte Kontrollgruppe wurde bei der Messung des Farbumschlages im MTT-Reader als 100 % festgesetzt. Die Ergebnisse wurden in Bezug zur Kontrolle in Prozent angegeben. Die Wachstumshemmung der Zelllinien unter Behandlung mit den Testsubstanzen wurde als Prozent in Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

Die drei Zelllinien wurden anschließend mit 2,5 µM GW9662 und zunehmenden Konzentrationen von Pioglitazon und Telmisartan behandelt. Mit Hilfe des MTT-Tests konnte untersucht werden, ob die Zellviabilität der Zelllinien HT 29, SW 480 und SW 620 durch die PPAR-γ unabhängige Behandlung mit Pioglitazon und Telmisartan gehemmt werden kann. Die Messungen erfolgten nach 72 Stunden Inkubationszeit nach Protokoll. Um auszuschließen, dass die auftretende Wachstumshemmung durch das Lösungsmittel bedingt ist, wurde DMSO als Kontrollgruppe mitgeführt. Diese unbehandelte Kontrollgruppe wurde bei der Messung des Farbumschlages im MTT-Reader als 100% festgesetzt. Die Ergebnisse wurden in Bezug zur Kontrolle in Prozent angegeben. Die Wachstumshemmung der Zelllinien unter Behandlung mit den Testsubstanzen wurde als Prozent in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

### **2.2.2.2 Zellzählung**

Die Zellzählung gehört zu den Vitalitätstests und erfasst die stoffwechselaktiven Zellen. Das Prinzip der Methode beruht auf der veränderten Durchlässigkeit der Zellmembranen toter Zellen, die sich auch vom Zellverband ablösen. Diese abgestorbenen Zellen nehmen den benutzten Farbstoff auf, die vitalen Zellen dagegen nicht.

Die Zellen wurden nach Protokoll trypsiniert und in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml in die Vertiefungen einer 6 Wellplatte pipettiert. Die Platte wurde ca. 24 h bei 37 Grad und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch Absaugen wurde verbrauchtes serumhaltiges Medium von allen 6 Wells vorsichtig entfernt und 2 ml frisches warmes Nährmedium überall hinzugegeben. Die Einteilung der Platte für die zu untersuchenden Substanzen erfolgte nach Protokoll. Als Negativkontrolle diente der Zusatz von Kulturmedium plus DMSO (1. Reihe). Die Zellen wurden für weitere 3 Tage kultiviert und das serumhaltige Medium wurde durch vorsichtiges Absaugen entfernt. Die Zellen wurden

mit 1 ml PBS Puffer in allen Wells 2x gespült. 200 µl Trypsin (5 Tröpfchen) wurde zum Ablösen der Zellen überall hinzugegeben und anschließend bei 37° inkubiert. Der Inhalt wurde in Collection tubes überführt und gut gemischt. Anschließend erfolgte die Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer. 20 µL der Zellsuspension wurden mit 80 µL einer Trypanblaulösung zusammengegeben und gemischt. Mit einer 20 µL Pipette wurde die angefärbte Suspension in die Zählkammer gegeben, bis diese vollständig gefüllt war. Anschließend erfolgte eine 1 bis 2-minütige Wartezeit, damit sich die Zellen am Boden absetzen konnten. Zur Auszählung wurde die Neubauer-Zählkammer unter ein Mikroskop mit 10-40fach vergrößerndem Objektiv gelegt und die Einteilungslinien der Kammer ins Blickfeld geschoben. Es wurde die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der blau gefärbten (toten) Zellen bestimmt. Alle Zellen, deren Kern bzw. Zytoplasma eine Blaufärbung zeigten, wurden als angefärbt und damit tot oder defekt betrachtet. Auch diejenigen Zellen, die nur eine schwache Blaufärbung des Zellkerns zeigten, wurden als tot gezählt.

Zur Wachstumsinhibition wurden alle drei Zelllinien gegenüber Pioglitazon und Telmisartan untersucht. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wie bei den MTT-Tests wurden die in 6-Well-Platten ausgesetzten Zellen mit ansteigender Konzentration der Testsubstanzen behandelt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde die Anzahl der proliferierenden Zellen mittels Auszählung in der Neubauerzählkammer gemäß dem Arbeitsprotokoll bestimmt. Abbildungen 8 und 9 fassen diese Ergebnisse zusammen.

Zur PPAR-γ unabhängigen Antiproliferation wurden alle drei Zelllinien gegenüber Pioglitazon und Telmisartan untersucht. In einem ähnlichen Versuchsaufbau, wie bei dem MTT-Test, wurden die in 6-Well-Platten ausgesetzten Zellen mit 2,5 µM GW9662 und ansteigender Konzentration der Testsubstanzen behandelt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde die Anzahl der proliferativen Zellen mittels Auszählung in der Neubauerzählkammer gemäß dem Arbeitsprotokoll bestimmt. Abbildungen 10 und 11 fassen diese Beobachtungen zusammen.

### **2.2.2.3 Caspase-3/7 Assay**

Caspase-3/7 Assay ist ein homogener Lumineszenz-basierter Assay zur Bestimmung der Caspase 3 und Caspase 7-Aktivität in apoptotischen Zellen in Kulturen. Im Rahmen der Apoptose wird in der Zelle eine Proteasekaskade aktiviert. Diese Kaskade enthält verschiedene Caspasen. Die Caspasen setzen sich zusammen aus Initiator Caspasen, die zu Beginn der Apoptose aktiviert werden sowie Effektor Caspasen (wie Caspase 3 und Caspase 7), die diverse Proteine für die Zellintegrität beeinflussen. Das Prinzip des Assays beruht auf der Spaltung des prolumineszenten Caspase-3/7-Substrates, Ac-DEVD-AFC.

Dadurch wird AFC-Fluorophore freigesetzt, mit dem blaue Lumineszenz bei 380 nm/500 nm erzeugt wird. Je höher die Fluoreszenz, desto höher ist die Caspase-3/7-Aktivität, welche als Maß für die Apoptoserate herangezogen werden kann.

Die Zellen wurden nach Protokoll trypsiniert und in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml in die Vertiefungen einer 6 Wellplatte pipettiert. Die Platte wurde ca. 24 h bei 37 Grad und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch das Absaugen wurde verbrauchtes serumhaltiges Medium von allen 6 Wells vorsichtig entfernt und 2 ml frisches warmes Nährmedium hinzugegeben. Die Einteilung der Platte für die untersuchenden Substanzen erfolgte nach Protokoll. Die Zellen wurden für weitere 3 Tage kultiviert. Die ersten Eppendorfgefäße wurden beschriftet und anschließend aufs Eis gestellt. Das verbrauchte Medium wurde von allen Wells, außer den Wells 4 und 5, von Platte 1 entfernt. Der Lysepuffer wurde mit der Verdünnung 1:10 dd H<sub>2</sub>O angesetzt. 300 µl verdünnter Lysepuffer wurde in allen Wells, außer den Wells 4 und 5, der Platte 1 hinzugegeben. Die Zellen wurden vom Plattenboden durch das Schaben abgelöst und der Inhalt in den Eppendorfgefäße überführt. Die Gefäße wurden 30 Minuten bei 4°C rotiert. Die weiteren Eppendorfgefäße wurden ebenfalls beschriftet und aufs Eis gestellt. Es wurde 10 Minuten bei 4°C, 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert oder gemessen.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation der Zelllinien wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen nach Protokoll geerntet. Die Röhrchen und Eppendorfgefäße wurden beschriftet und im Eisbad gekühlt. Das alte verbrauchte Medium wurde von allen 6 Wells Platten abgesaugt und 2 ml PBS (mit Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup>) hinzugefügt. Die Salzlösung PBS wurde entfernt und noch einmal überall mit PBS hinein pipettiert. Die Zellen wurden vom Plattenboden durch Abkratzen abgelöst und der Inhalt in die Eppendorfgefäßen überführt. Die Gefäße wurden 5 Minuten bei 4°C rotiert, 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden für die RNA-Extraktion wie folgt entsprechend des Herstellerprotokolls verarbeitet.

Bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen konnten direkt durch Zugabe des Lyse Puffer RA1 lysiert werden. Zu jedem Pellet wurden 350 µl RA1 + 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Mastermix ansetzen!) pipettiert und mit der Pipette homogenisiert. Für jede Probe wurde eine NucleoSpin Filtereinheit (violett) in ein 2 ml Sammelgefäß gesetzt und beschriftet. Die lysierten Zellen wurden hinein pipettiert und für 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert. Zu dem Durchfluss wurden 350 µl

70%-iger Ethanol pipettiert, gemischt und anschließend die gesamte Lösung auf eine NucleoSpin RNA II Säule (hellblau) geladen. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Sekunden bei 11000 rpm.

Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt. Um die Membran zu entsalzen wurde auf die Säule 350 µl MDB pipettiert und für 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Auf die Säule wurde 95 µl einer DNase Lösung (für jede Probe 10 µl reconstituted rDNase mit 90 µl Reaction Buffer for rDNase) pipettiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 15 Minuten wurde auf die Säule 200 µl des 1. Waschpuffers RA2 pipettiert und für 30 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 600 µl des 2. Waschpuffers RA3 und es wurde für 30 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säulen wurden in das Sammelgefäß zurückgestellt. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl des 2. Waschpuffers RA3 und eine Zentrifugation bei 11000 rpm für 2 Minuten, um die Säule zu trocknen. Die Säulen wurden in beschriftete (sterile) 1,5 ml Eppendorfgefäße gestellt. Durch Zugabe von 20 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) direkt auf den Mittelpunkt der Säule und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 11000 rpm erfolgte die Auswaschung der RNA.

### **2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.**

Der Reinheitsgrad der ausgebeuteten RNA wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Von den 20 µl RNA-Ausbeuten [im Eisbad] wurde 1 µl abgenommen und mit 99 µl dd H<sub>2</sub>O [1:100] verdünnt. Als Referenz (Nullabgleich) diente 100 µl dd H<sub>2</sub>O. Die verdünnte RNA-Probe wurde in eine Küvette pipettiert. Die Extinktion wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus diesen Werten ließ sich unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration der RNA-Lösung errechnen. Zur Bestimmung der Reinheit wurde das Verhältnis der Extinktionen  $OD_{260}/OD_{280}$  berechnet, deren Werte sollten dabei ca. zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

### **2.3.3 Reverse Transkription: Umschreibung der RNA in cDNA**

Das Umschreiben der RNA in einzelsträngige cDNA wurde mittels der M-MLV Reverse Transkriptase durchgeführt, die RNA abhängige DNA-Polymerase-Aktivität aufwies. Zuerst wurde je Ansatz 1 µg RNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 16 µl gebracht. Das Gemisch wurde dann 5 Minuten zur Denaturierung der RNA bei 70°C erwärmt und anschließend sofort auf dem Eis abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde der Master-Mix wie folgt angesetzt: 1 µl dNTP-Mix, 1 µl Oligo-(dT)-Primer, 5 µl 5X Reaktion Puffer, 1 µl RNaseinhibitor, 1 µl

M-MLV Reverse Transkriptase [Endvolumen der Bestandteile ist 9 µl]. Je Ansatz wurde dann 9 µl Master Mix zugegeben und das Gesamtvolumen betrug 25 µl. Alle Proben wurden zentrifugiert, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 70°C erwärmt. Abschließend wurden die Proben auf dem Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert.

### **2.3.4 Real-Time-quantitative-PCR**

Mit dem RTq-PCR-Verfahren ist eine spezifische Quantifizierung der fluoreszierenden PCR-Produkte möglich. Das Prinzip der Methode beruht auf der Messung der Fluoreszenz, die mit der PCR-Produktbildung durch die Taq-Polymerase einhergeht. Die Voraussetzung dafür ist die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes, SYBR Green I an die Doppelstrang-DNA. Mit zunehmender Menge an PCR-Produkten steigt auch die Fluoreszenz. Die Quantifizierung erfolgt mittels der Software-gestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Dieser Wert ist wiederum wichtig für die Ermittlung des Schwellenwertzyklus, also dem Zyklus, bei dem dieser Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschritten wird.

Die Zielgene (PPAR- $\gamma$ , AGTR-1 und Cystatin) wurde in Dreifachbestimmung angesetzt und pro Reaktion ein Ansatz von 10 µl wie folgt pipettiert: 0,5 µl Primer AS (10 pmol/µl), 0,5 µl Primer SE (10 pmol/µl), 5 µl Maxima SYBR Green (2x) und 4 µl verdünnte cDNA (1:4). Um die Spezifität der Untersuchung zu überprüfen wurde als Negativkontrolle der Mastermix ohne cDNA in H<sub>2</sub>O pipettiert. Als interne Kontrolle wurde bei allen Durchläufen die Expression des Haushaltgens (Housekeeping-Gen) 28s ribosomale RNA ermittelt. Housekeeping-Gene sind Gene, die für wichtige lebensnotwendige Proteine kodieren, deren Aktivitäten für die normale Zellfunktion wichtig sind. Diese Gene werden unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert und haben daher eine gleichmäßige Expression unter allen untersuchenden Bedingungen. So ein Gen soll sorgfältig ausgesucht werden. Für unsere Versuche wurde 28s verwendet, das im Labor bereits im Rahmen anderer Untersuchungen mit unterschiedlichen Zelllinien etabliert worden war. Alle Ansätze wurden in vorgekühlte Light Cycler Glaskapillaren überführt und sehr kurz zentrifugiert, das heißt 5 Sekunden bei 3000g. Für diese Arbeit wurde das LightCycler™ 3.5 der Firma Roche Diagnostics eingesetzt. Zu Beginn jedes Versuches wurde das Protokoll „64°C SYBR Green-quick-fermentas-65Cycles“ verwendet. Es fing mit einem „Hot Start“, 10 Minuten lang an und dabei folgte initial die Denaturierung bei 94°-95°C. Dies verhinderte eine frühzeitige Bildung von doppelsträngiger DNA. Danach folgte die Amplifikation (3-Step-Cycling) mit Denaturierung (Die Denaturierung der doppelsträngiger cDNA in Einzelstränge), Annealing (Anlagerung der Primer und Maxima SYBR Green an die Ziel-DNA) und Elongation

(Verlängerung des komplementären DNA-Stranges). Anschließend fand eine Abkühlung der Proben auf 40°C statt. Dieser Vorgang wiederholte sich 65 Mal (65 Zyklen) für alle Proben.

Grundsätzlich gibt es 2 Evaluationsmethoden in der Real-Time PCR: Absolute Quantifizierung und Relative Quantifizierung. Bei beiden Methoden wird der sogenannte CT- (Threshold-Cycle) oder CP-(Crossing Point) Wert bestimmt. Dieser Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, die notwendig sind, um eine konstante Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz zu erreichen. Bei der absoluten Quantifizierung wird aus einer externen Standard DNA-Probe eine Verdünnungsreihe hergestellt, die die Sequenz des Ziel-Gens enthält und deren Konzentration bzw. Kopienzahl bekannt ist. Nach der Amplifikation wird eine Eichkurve anhand der CT-Werte erstellt. Man kann über die CT-Werte einer unbekanntes DNA-Probe die DNA-Ausgangskonzentration (in µg oder Kopienzahl/µl) aus der externen Standardkurve ermitteln. Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge des Zielgens im Verhältnis zu der Menge des Referenzgens (Housekeeping-Gens) in der Probe dargestellt. Hierzu braucht man 2 Standardkurven: eine für das Housekeeping-Gen und die andere für das Zielgen. Mittels der Light Cycler 3.5 Software kann man das Expressionslevel des Zielgens gegenüber des Referenzgens ermitteln, allerdings nicht die Menge. Der Vorteil der relativen Quantifizierung liegt daran, dass die Inhomogenitäten im Ausgangsmaterial (Variation in der RNA-Qualität oder RNA-Gehalt) ausgeglichen werden können (Normalisierung). In dieser vorliegenden Übersichtsarbeit wurde die relative Quantifizierung verwendet. Die Sequenzen für die eingesetzten Primer sind wie folgt:

<b>Ziel m-RNA</b>	<b>Primer</b>		<b>Oligonukleotid-Sequenz</b>
AGTR-1	AGTR-1 SE	Vorwärts-(Forward-)Primer	<b><i>ACAGCTTGGTGGTGATAGTC</i></b>
AGTR-1	AGTR-1 AS	Rückwärts-(Reverse-)Primer	<b><i>CAATGCTGAGACACGTGAG</i></b>
PPAR-γ	PPAR-γ SE	Vorwärts-(Forward-)Primer	<b><i>CAAGCCCTTCACTACTGTTG</i></b>
PPAR-γ	PPAR-γ AS	Rückwärts-(Reverse-)Primer	<b><i>GCTTATCTCCACAGACACG</i></b>
Cystatin	CSTA SE	Vorwärts-(Forward-)Primer	<b><i>AACCCGCCACTCCAGAAATC</i></b>
Cystatin	CSTA AS	Rückwärts-(Reverse-)Primer	<b><i>CCGTCAGCTCGTCATCCTTG</i></b>
28S	28S SE LC	Vorwärts-(Forward-)Primer	<b><i>GTGACCTGCACAGTCTCAG</i></b>
28S	28S AS LC	Rückwärts-(Reverse-)Primer	<b><i>TAGTCCAGCTTGTCTCATCC</i></b>

Zur einheitlichen Auswertung des Expressionsmusters wurde der Mittelwert der Kontrollwerte (in 0,05 % DMSO) gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte der Konzentrationen von Testsubstanzen wurden in Bezug zur Kontrolle als eine relative Änderung in Quotient berechnet. Diese Ergebnisse werden in der Tabelle 4 und 5 sowie in Abbildungen 16-25.

## **2.4 Statistische Auswertung**

In dieser vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche in dreifach unabhängigen Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der daraus entstandenen Daten erfolgte mit Hilfe der Softwareprogramme Microsoft Excel, PASW Statistics 18 und GraphPad Prism 5. Dabei wurden jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) angegeben. Das Signifikanzniveau ist mit  $\alpha = 0,05$  definiert.

### **3 Ergebnisse**

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde die Wirkung von Pioglitazon (orales Antidiabetikum) und Telmisartan (orales Antihypertonikum) als Vollagonisten bzw. partiellem Agonisten des PPAR- $\gamma$  Rezeptors auf das Kolonkarzinom in vitro untersucht. Dabei wird der Einfluss auf das Wachstumsverhalten humaner Kolonkarzinomzelllinien in Hinsicht auf die Proliferation, Apoptose und eine Veränderung der Expression der Zielgene von PPAR- $\gamma$  dargestellt.

#### **3.1 Einfluss von Pioglitazon und Telmisartan auf Proliferation und Apoptose von humanen Kolonkarzinomzelllinien.**

##### **3.1.1 Änderung der Zellviabilität unter Einfluss von Pioglitazon und Telmisartan**

Die Behandlung der Zellen mit Pioglitazon führte bei allen Zelllinien bei zunehmenden Konzentrationen zu einer Abnahme vitaler wachsender Zellen. Bereits bei geringeren Konzentrationen verursachte Pioglitazon das Absterben der Zellen. Mit einer Konzentration von 0,2  $\mu$ M Pioglitazon lag die Apoptoserate bei 2,69% (HT 29) bei 0,37% (SW 480) und bei 3,26% (SW 620) ( $p < 0,05$ ). Mit einer Konzentration von 5  $\mu$ M Pioglitazon lag die Apoptoserate bei 15,67% (HT 29) bei 14,19 % (SW 480) und bei 12,24 % (SW 620) ( $p < 0,05$ ).

Die Behandlung mit Telmisartan führte ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer prozentualen Abnahme überlebender Zellen. Mit einer Konzentration von 0,20  $\mu$ M Telmisartan lag die Apoptoserate bei 1,35% (HT 29) bei 1,87 % (SW 480) und bei 3,67 % (SW 620) ( $p < 0,05$ ). Bei 5  $\mu$ M war eine signifikante Hemmung der Wachstumsrate bei allen Zelllinien erkennbar und dabei lag die Apoptose-Rate bei den HT 29 Zellen auf 16,06%, bei den SW 480 auf 5,16% und bei den SW 620 auf 17,82% ( $p < 0,05$ ). Abbildungen 4 und 5 fassen diese Ergebnisse zusammen.

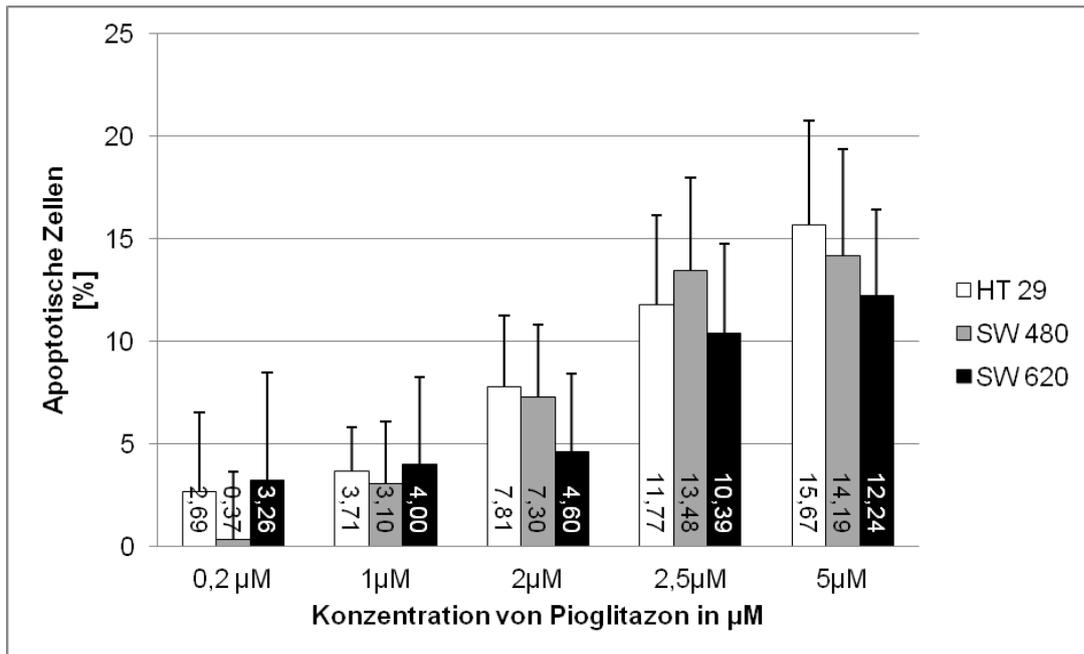


Abbildung 4: Die Zellviabilität in Prozent unter Pioglitazoninkubation im MTT. Dargestellt ist das Verhältnis einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2 µmol/L- 5 µmol/L) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

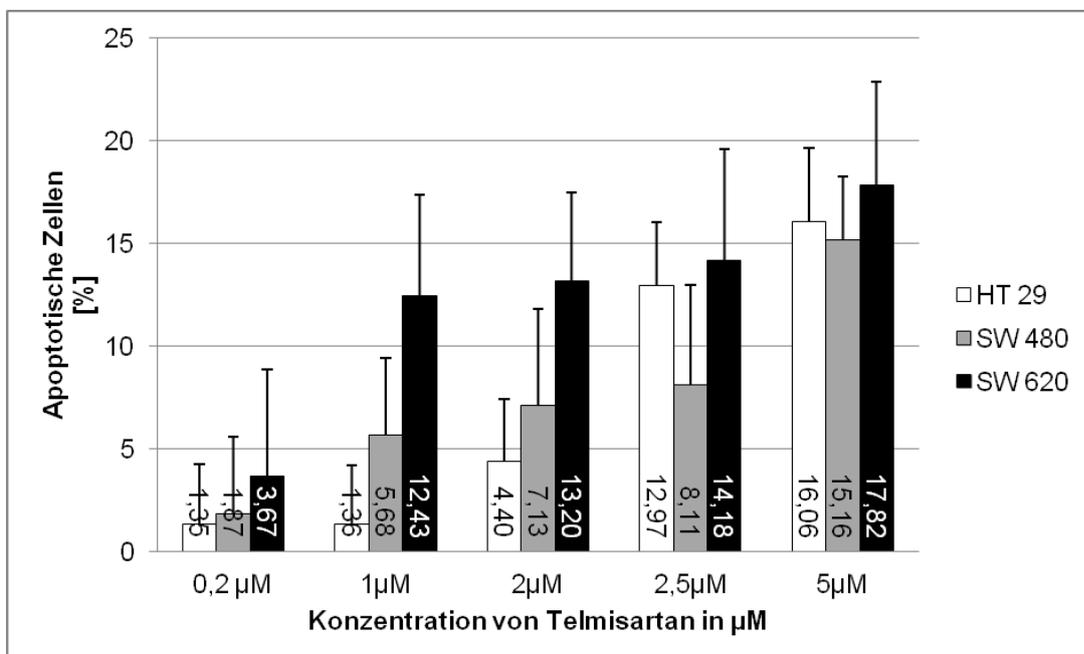


Abbildung 5: Die Zellviabilität in Prozent unter Telmisartaninkubation im MTT. Dargestellt ist das Verhältnis einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2 µmol/L- 5 µmol/L) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.1.1 Der PPAR- $\gamma$ unabhängige antiproliferative Effekt**

Im folgenden Experiment wurde PPAR $\gamma$  durch den synthetischen PPAR $\gamma$  Antagonisten GW9662 blockiert. Eine anschließende Inhibition der Zellproliferation würde somit PPAR $\gamma$  unabhängige Mechanismen implizieren.

In den Experimenten zur Untersuchung des PPAR- $\gamma$  unabhängigen antiproliferativen Effekts ist die Anwendung des Inhibitors GW9662 essentiell. GW9662 ist ein synthetischer irreversibler PPAR- $\gamma$  Antagonist, der sich an die LBD bindet. Diese Bindung verhindert sowohl die Bindung der natürlichen als auch synthetischen Liganden an die LBD.

Insgesamt lässt sich durch den Einsatz von GW9662 eine geringere Wachstumshemmung bei allen Zelllinien beobachten. Die Behandlung der Zellen mit Pioglitazon führte bei allen Zelllinien zu einer Abnahme vitaler wachsender Zellen bei zunehmenden Konzentrationen, trotz der Wirkung des selektiven PPAR- $\gamma$ -Blockers, GW9662. Bereits bei geringeren Konzentrationen verursachte Pioglitazon das Absterben der Zellen. Mit einer Konzentration von 0,20  $\mu$ M Pioglitazon lag die Apoptoserate bei 1,90% (HT 29) bei 4,74 % (SW 480) und bei 8,30 % (SW 620) ( $p < 0,05$ ). Bei der Behandlung mit 5  $\mu$ M reagierte Pioglitazon mit einem signifikanten Effekt auf die Wachstumshemmung am Stärksten bei den SW 620 Zellen. Bei 5  $\mu$ M lag die Apoptoserate bei den HT 29 Zellen auf 6,75 %, bei den SW 480 auf 11,22 % und bei den SW 620 auf 16,11 % ( $p < 0,05$ ).

Bei Behandlung mit Telmisartan führte dies ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer prozentualen Abnahme überlebender Zellen. Schon bei der niedrigsten Konzentration von 0,2  $\mu$ M wurde ein massiver Wachstumsrückgang von 3,40% bei den HT 29 Zellen, 11,47% bei den SW 480 und 13,26 % bei SW 620 Zellen festgestellt. Bei 5  $\mu$ M konnte eine signifikante Hemmung der Wachstumsrate bei allen Zelllinien festgestellt werden und dabei lag die Apoptose-Rate bei den HT 29 Zellen auf 14,36 %, bei den SW 480 auf 19,94 % und bei den SW 620 auf 27,66 % ( $p < 0,05$ ). Abbildungen 6 und 7 fassen diese Ergebnisse zusammen.

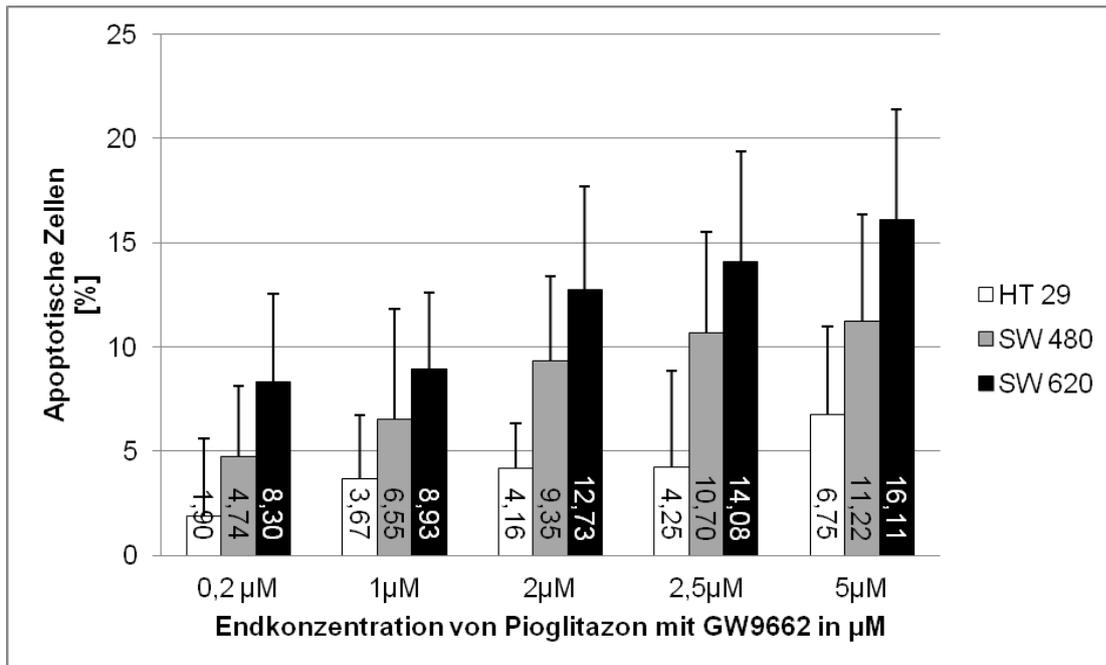


Abbildung 6: Die Zellviabilität in Prozent unter Pioglitazon und GW9662 Koinkubation im MTT-Assay. Dargestellt ist das Verhältnis von einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2µmol/L- 5µmol/L) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

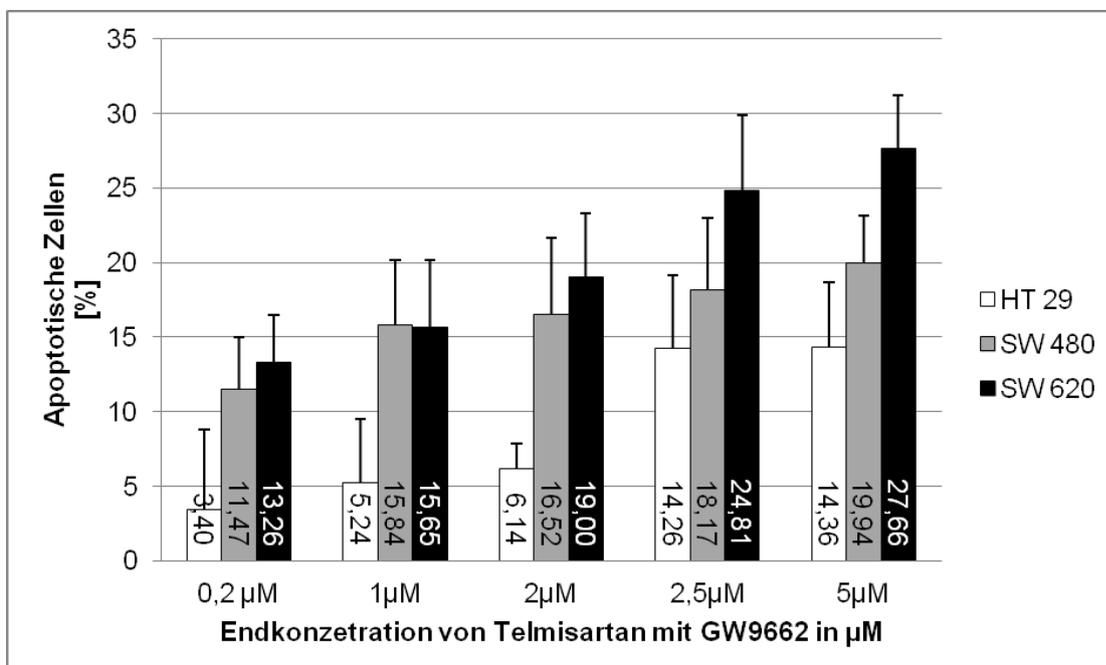


Abbildung 7: Die Zellviabilität in Prozent unter Telmisartan und GW9662 Koinkubation im MTT-Assay. Dargestellt ist das Verhältnis von einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2µmol/L- 5µmol/L) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.2 Antiproliferativer Effekt unter Einfluss von Pioglitazon und Telmisartan**

Eine konzentrationsabhängige Antiproliferation wurde ebenfalls dabei festgestellt, wobei sich bei der höchsten verwendeten Konzentration in allen Zellen der größte Effekt zeigte. Die Hemmung der Proliferation wurde durch eine höhere Pioglitazonkonzentration signifikant verstärkt: HT 29 mit 32,38 %, SW 480 mit 8,14 % und SW 620 mit 46,94 % ( $p < 0,05$ ). Mit einer Konzentration von 0,20  $\mu\text{M}$  Pioglitazon lag die Apoptoserate bei 11,49% (HT 29) bei 16,51 % (SW 480) und bei 19,65 % (SW 620) ( $p < 0,05$ ). Bei allen Zelllinien hatte Telmisartan mit 5  $\mu\text{M}$  die höchste Antiproliferation: HT 29 mit 38,38 %, SW 480 mit 52,08 % und SW 620 mit 53,06 % ( $p < 0,05$ ). Mit einer Konzentration von 0,20  $\mu\text{M}$  Telmisartan lag die Apoptoserate bei 10,97% (HT 29) bei 19,44 % (SW 480) und bei 23,14 % (SW 620) ( $p < 0,05$ ). Abbildungen 8 und 9 fassen diese Ergebnisse zusammen.

#### **3.1.2.1 Das PPAR- $\gamma$ unabhängige Wachstumsverhalten**

Eine konzentrationsabhängige Antiproliferation wurde dabei ebenfalls festgestellt, wobei bei der höchsten verwendeten Konzentration in allen Zellen sich der größte Effekt zeigte. Bei allen Zelllinien hatte Telmisartan mit 5  $\mu\text{M}$  die höchste Apoptose: HT 29 mit 42,79 %, SW 480 mit 50,85 % und SW 620 mit 47,31 % ( $p < 0,05$ ). Mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Pioglitazon lag vergleichbar die Apoptoserate bei 32,67% (HT 29) bei 49,10 % (SW 480) und bei 43,36 % (SW 620) ( $p < 0,05$ ). Abbildungen 10 und 11 fassen diese Ergebnisse zusammen.

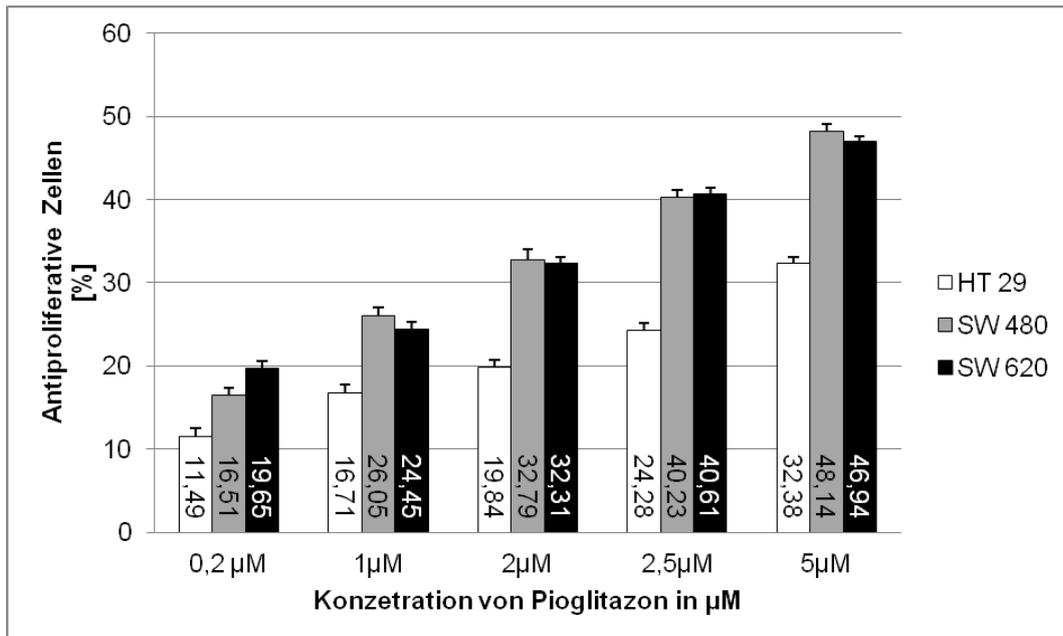


Abbildung 8: Die Rate der antiproliferativen Zellen in Prozent unter Pioglitazoninkubation durch Zellzählung erfasst. Dargestellt ist das Verhältnis einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2 $\mu\text{mol/L}$ - 5 $\mu\text{mol/L}$ ) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

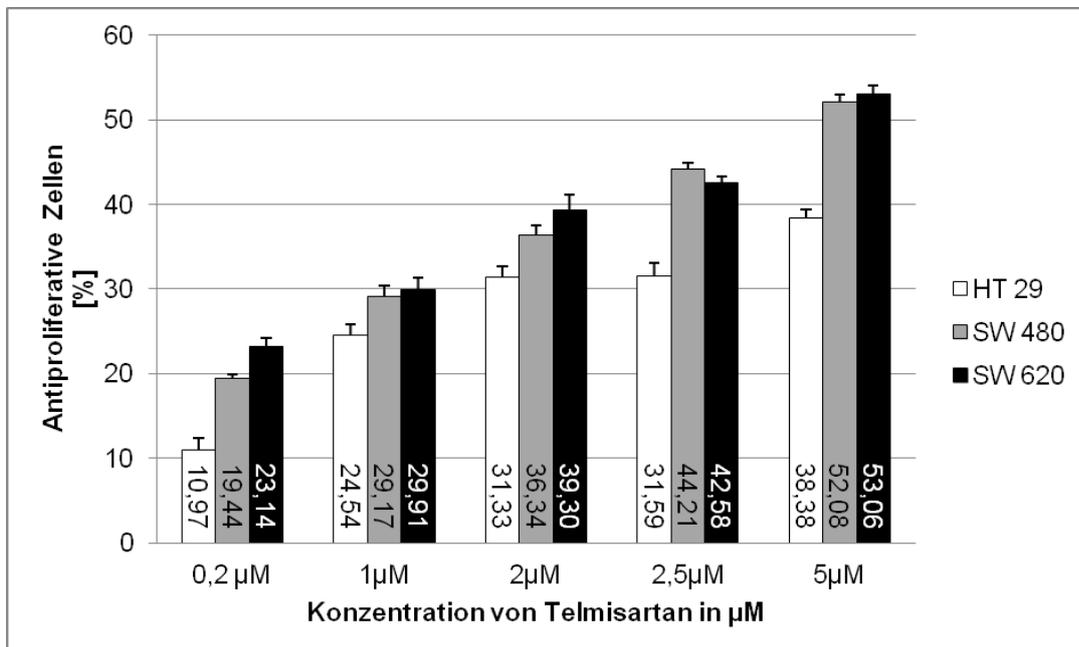


Abbildung 9: Die Rate der antiproliferativen Zellen in Prozent unter Telmisartaninkubation durch Zellzählung erfasst. Dargestellt ist das Verhältnis einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2 $\mu\text{mol/L}$ - 5 $\mu\text{mol/L}$ ) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

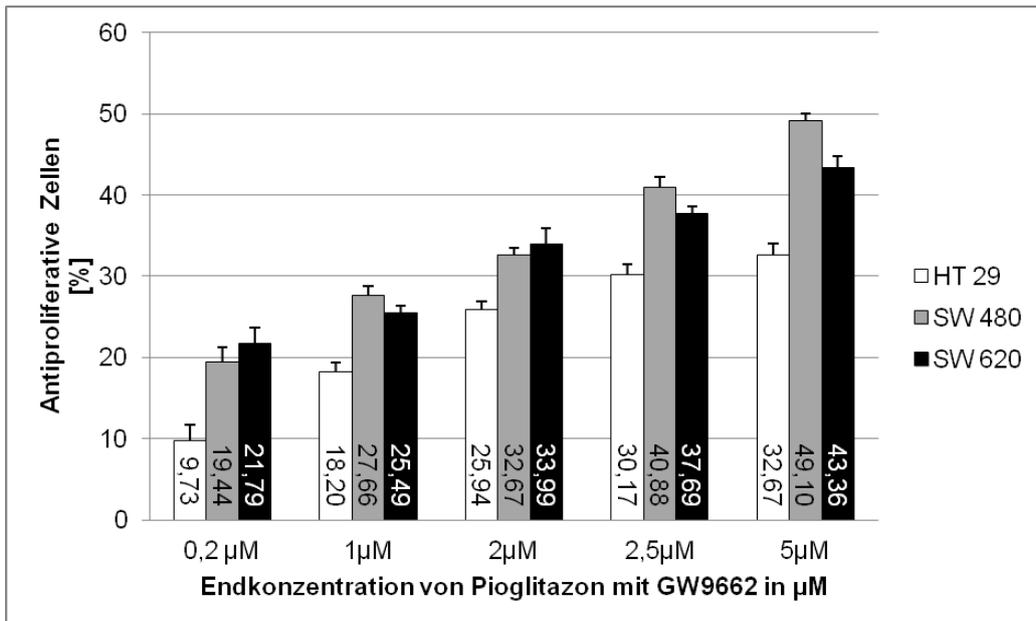


Abbildung 10: Die Rate der antiproliferativen Zellen in Prozent unter Pioglitazon und GW9662 Koinkubation durch Zellzählung erfasst. Dargestellt ist das Verhältnis von einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2µmol/L- 5µmol/L) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

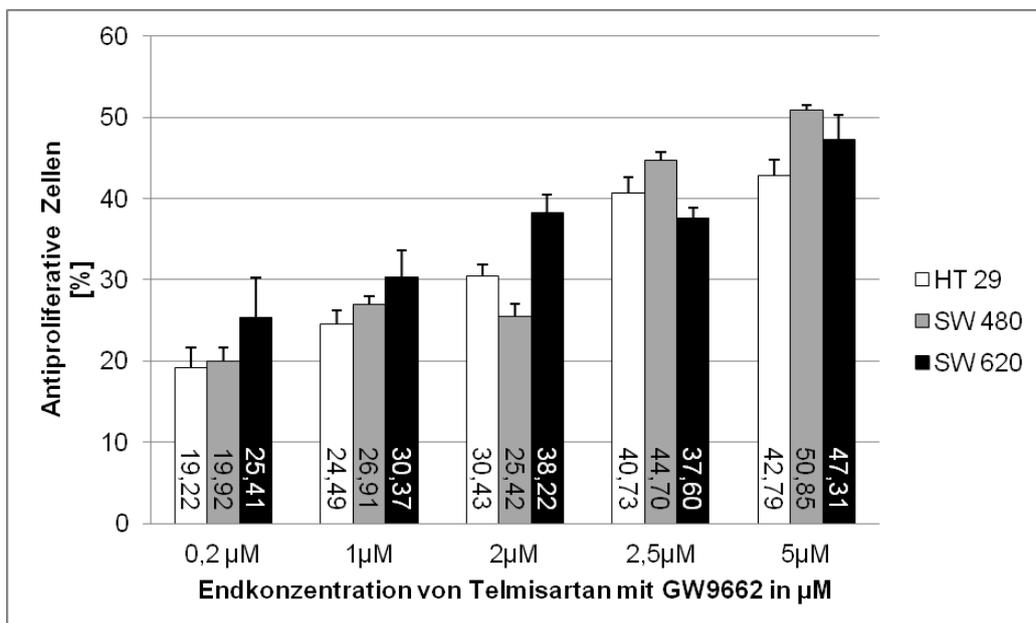


Abbildung 11: Die Rate der antiproliferativen Zellen in Prozent unter Telmisartan und GW9662 Koinkubation durch Zellzählung erfasst. Dargestellt ist das Verhältnis von einer avitalen Zellpopulation in verschiedenen Konzentrationen (0,2µmol/L- 5µmol/L) zu einer in Lösungsmittel DMSO behandelten proliferierenden vitalen Zellpopulation. Gezeigt ist ein signifikantes repräsentatives Ergebnis des Mittelwerts (mit Standardabweichung des Mittelwerts) aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.3 Apoptose-Untersuchungen mittels Caspase 3-7 Assay**

#### **3.1.3.1 Apoptoseverhalten der Zellen behandelt nur mit den Testsubstanzen**

Nachdem die Proliferationshemmung behandelter Zellen mittels Pioglitazon und Telmisartan in den oben beschriebenen MTT und Zellzählung Experimenten nachgewiesen werden konnte, erfolgte der Apoptosenachweis hierbei durch die photometrische Messung (Endpoint-Messung) der Aktivität von Effektor Caspasen 3 und 7.

In den folgenden Grafiken ist die Relative Caspase 3-7 Aktivität der Zelllinien HT 29, SW 480 und SW 620 nach unterschiedlicher Behandlung dargestellt. Dabei ist diese Aktivität auf der Ordinate und die Konzentrationsreihe auf der Abszisse aufgetragen worden. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach Protokoll mit 0,05 % DMSO im Medium als Vehikel Kontrolle, Staurosporin im Medium als positive Kontrolle, Medium als negative Kontrolle und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen im Medium für 24 Stunden.

Nach der Durchführung der Apoptosemessung konnte zunächst festgestellt werden, dass es bei allen drei Zelllinien nach der Behandlung mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen zu einer Caspase 3-7 Aktivität kam. Diese Aktivität ist bei beiden Testsubstanzen in der Zelllinie SW 620 am Höchsten und die HT 29 Zellen weisen die niedrigste Aktivität auf. Es zeigte sich, dass Telmisartan und Pioglitazon ähnliche Aktivität der Caspasen 3 und 7 darstellt. Unter 5  $\mu$ M Telmisartaninkubation betrug die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen 3,37; bei den SW 480 Zellen 4,72 und bei den SW 620 Zellen 11,01. Unter einer Einzelinkubation mit 5  $\mu$ M Pioglitazon betrug die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen 1,73 bei den SW 480 Zellen 3,78 und bei den SW 620 Zellen 12,94.

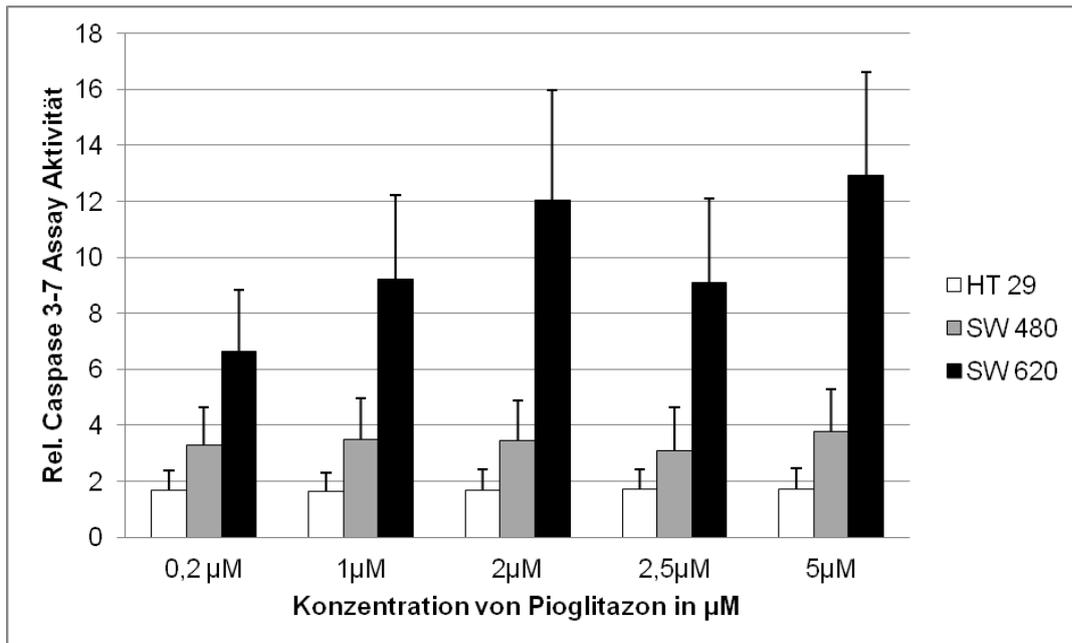


Abbildung 12: Einfluss von Pioglitazon auf die Induktion von Apoptose. Die Apoptose wurde durch Caspase 3/7- Assay bestimmt und versteht sich als eine luminometrische Messung von aktivierten Effektor Caspasen als Indikator für apoptotische Vorgänge in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt ist ein signifikantes Verhältnis der Mittelwerte von behandelten Zellen zu nur mit DMSO behandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

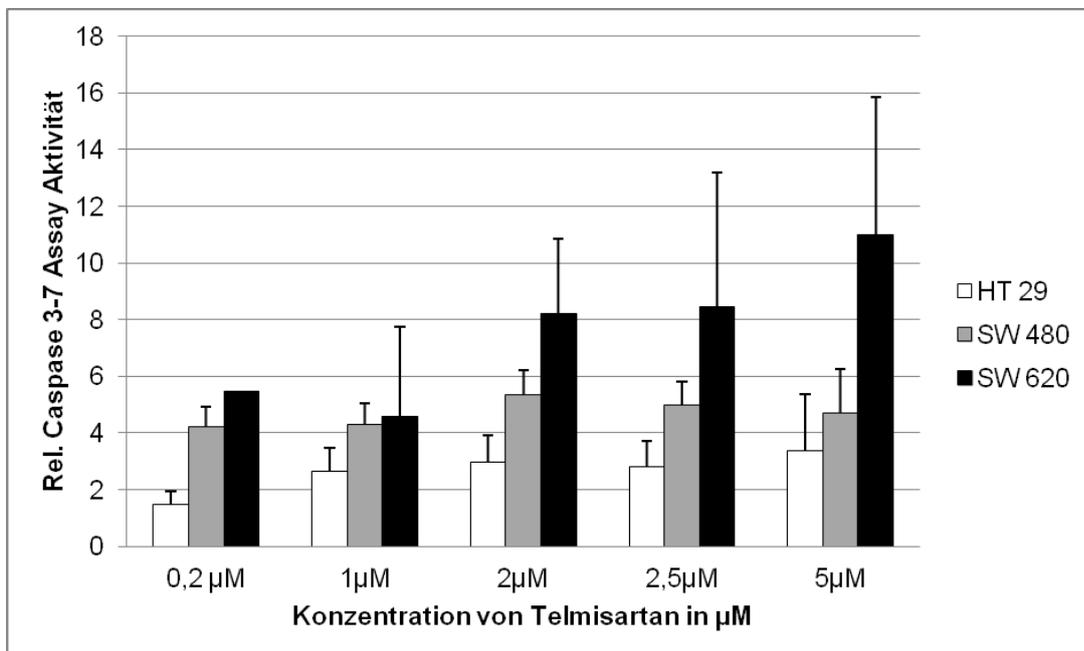


Abbildung 13: Einfluss von Telmisartan auf die Induktion von Apoptose. Die Apoptose wurde durch Caspase 3/7- Assay bestimmt und versteht sich als eine luminometrische Messung von aktivierten Effektor Caspasen als Indikator für apoptotische Vorgänge in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt ist ein signifikantes Verhältnis der Mittelwerte von behandelten Zellen zu nur mit DMSO behandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.3.2 Apoptoseverhalten GW9662-behandelter Zellen

Mit Hilfe des selektiven PPAR- $\gamma$ -Blockers, GW9662 konnte untersucht werden, ob die Caspase abhängige Apoptose durch die Behandlung mit Pioglitazon und Telmisartan in unterschiedlicher Konzentration PPAR- $\gamma$  unabhängig gehemmt werden kann. Der Versuchsaufbau ist ähnlich wie bei 3.1.3.1 und die Messungen erfolgten nach 24 Stunden. Um auszuschließen, dass die auftretenden Effekte durch das Lösungsmittel bedingt sind, wurde 0,05 % DMSO im Medium und GW9662 als Vehikel Kontrolle mitgeführt.

Die folgenden Abbildungen 14 und 15 veranschaulichen eine Caspase abhängige Apoptose Aktivität bei allen GW9662-behandelter Zelllinien. Nach 24-stündiger Behandlung mit den Testsubstanzen konnte immer noch eine signifikante, jedoch weniger starke Aktivität festgestellt werden. Ähnlich wie bei 3.5.1 ist diese Aktivität bei beiden Testsubstanzen in der Zelllinie SW 620 am Höchsten und die HT 29 Zellen weisen die niedrigste Aktivität auf. Es zeigte sich, dass Telmisartan und Pioglitazon eine ähnliche Aktivität der Caspasen 3 und 7 darstellt. Unter 5  $\mu$ M Telmisartaninkubation mit GW9662 betrug die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen 2,97; bei den SW 480 Zellen 4,58 und bei den SW 620 Zellen 11,60. Unter einer Koinkubation von 5  $\mu$ M Pioglitazon mit GW9662 betrug die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen 2,71 bei den SW 480 Zellen 4,52 und bei den SW 620 Zellen 8,28.

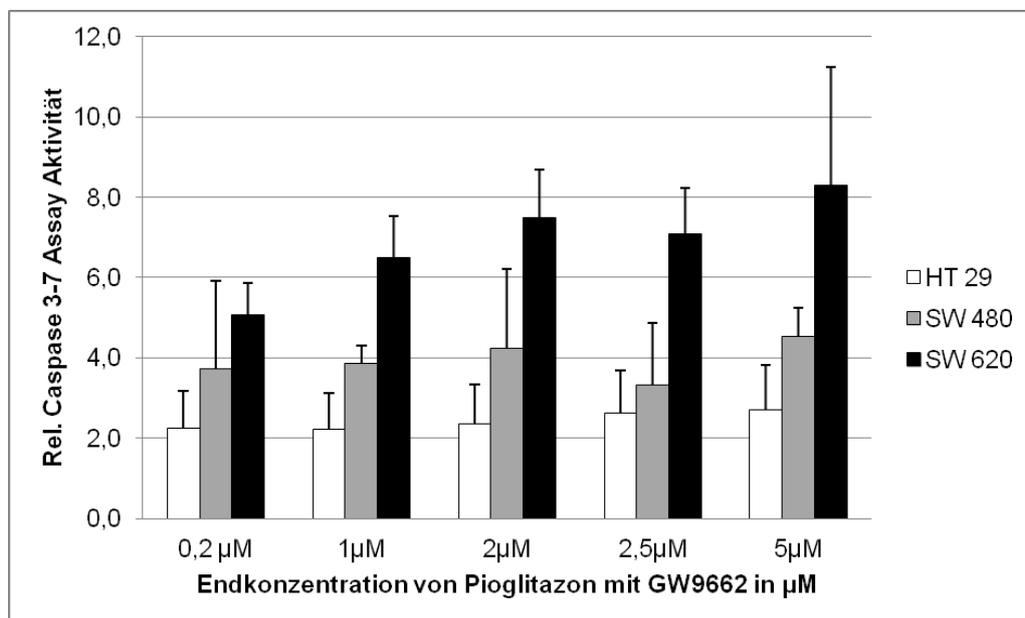


Abbildung 14: Einfluss von Pioglitazon mit GW9662 auf die Induktion von Apoptose. Die Apoptose wurde durch Caspase 3/7- Assay bestimmt und versteht sich als eine luminometrische Messung von aktivierten Effektor Caspasen als Indikator für apoptotische Vorgänge in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt ist ein signifikantes Verhältnis der Mittelwerte von behandelten Zellen zu nur mit DMSO behandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

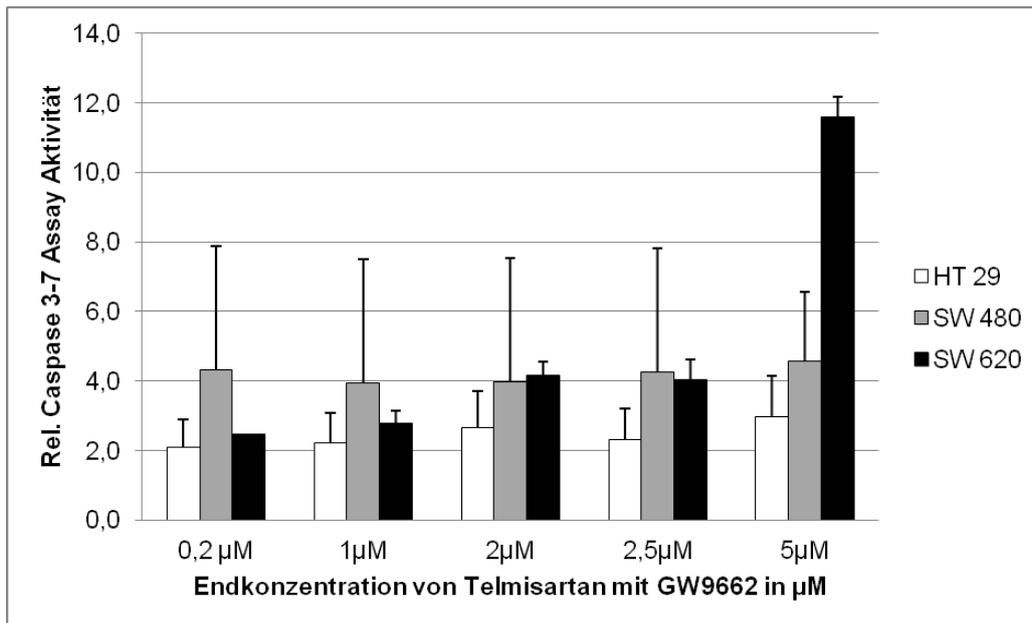


Abbildung 15: Einfluss von Telmisartan mit GW9662 auf die Induktion von Apoptose. Die Apoptose wurde durch Caspase 3/7- Assay bestimmt und versteht sich als eine luminometrische Messung von aktivierten Effektor Caspasen als Indikator für apoptotische Vorgänge in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt ist ein signifikantes Verhältnis der Mittelwerte von behandelten Zellen zu nur mit DMSO behandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

## 3.2 Regulation der m-RNA-Expression von PPAR- $\gamma$ und AGTR1

### 3.2.1 Zelllinien ohne GW9662 Vorbehandlung

Durch die Expression von Zielgenen PPAR- $\gamma$  und AGTR1 des Rezeptors kann die Auswirkung der Testsubstanzen dargestellt werden. Alle Zellen wurden mit den Testsubstanzen in ansteigender Konzentration und dem Lösungsmittel 0,05 % DMSO behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Real Time PCR. Als interne Kontrolle diente die stabil exprimierte 28S, auf die die einzelnen Werte bezogen wurden. Um zu zeigen, dass PPAR- $\gamma$  tatsächlich in unseren Zelllinien aktiviert wurde, untersuchten wir Cystatin A als positive Kontrolle mittels Real Time PCR. Cystatin A, auch als Stefin A bekannt, ist ein Cystein-Protease-Inhibitor, der in zahlreichen Geweben exprimiert ist. Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Cystatin A in der Regulation des Tumorwachstums beteiligt ist [63]. Cystatin A ist ein bewährtes Zielgen des PPAR- $\gamma$ , das durch Liganden-Aktivierung des PPAR- $\gamma$  hochreguliert wird.

Bei der mit niedrigster Dosis (0,2 µM) zeigte sich eine Induktion, die sich von der Nullkontrolle mit 0,05 % DMSO unterscheidet. Eine deutliche Erniedrigung der Expression war schließlich bei der höchsten Konzentration der Testsubstanzen festzustellen. Unter Telmisartaninkubation war die Expression der Zielgene am Niedrigsten. Alle Ergebnisse sind signifikant und aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ). Cystatin wurde, wie erwartet, aus anderen Arbeiten hochreguliert. Tabelle 4 und Abbildungen 16-20 fassen die beschriebenen Beobachtungen zur Pioglitazon- und Telmisartanwirkung auf die Expression der Zielgene in unserem Zellkulturmodell zusammen.

	Telmisartan		Pioglitazon	
	0,2 µM	2,5 µM	0,2 µM	2,5 µM
<b>HT 29</b>				
<i>AGTR1</i>	0,34	0,10	0,66	0,22
<i>PPAR-γ</i>	0,47	0,33	0,73	0,31
<b>SW 480</b>				
<i>AGTR1</i>	0,60	0,23	0,91	0,65
<i>PPAR-γ</i>	0,47	0,36	0,68	0,35
<b>SW 620</b>				
<i>AGTR1</i>	0,57	0,25	0,82	0,39
<i>PPAR-γ</i>	0,64	0,40	0,73	0,52

Tabelle 4: Eine zusammenfassende Darstellung der relativen Expression der Zielgene AGTR1 und PPAR-γ in den Zelllinien HT 29, SW 480 und SW 620 als Quotient (Mittelwert der Kontrolle vs. Mittelwert der Testsubstanzen in 0,2 und 2,5 µM)

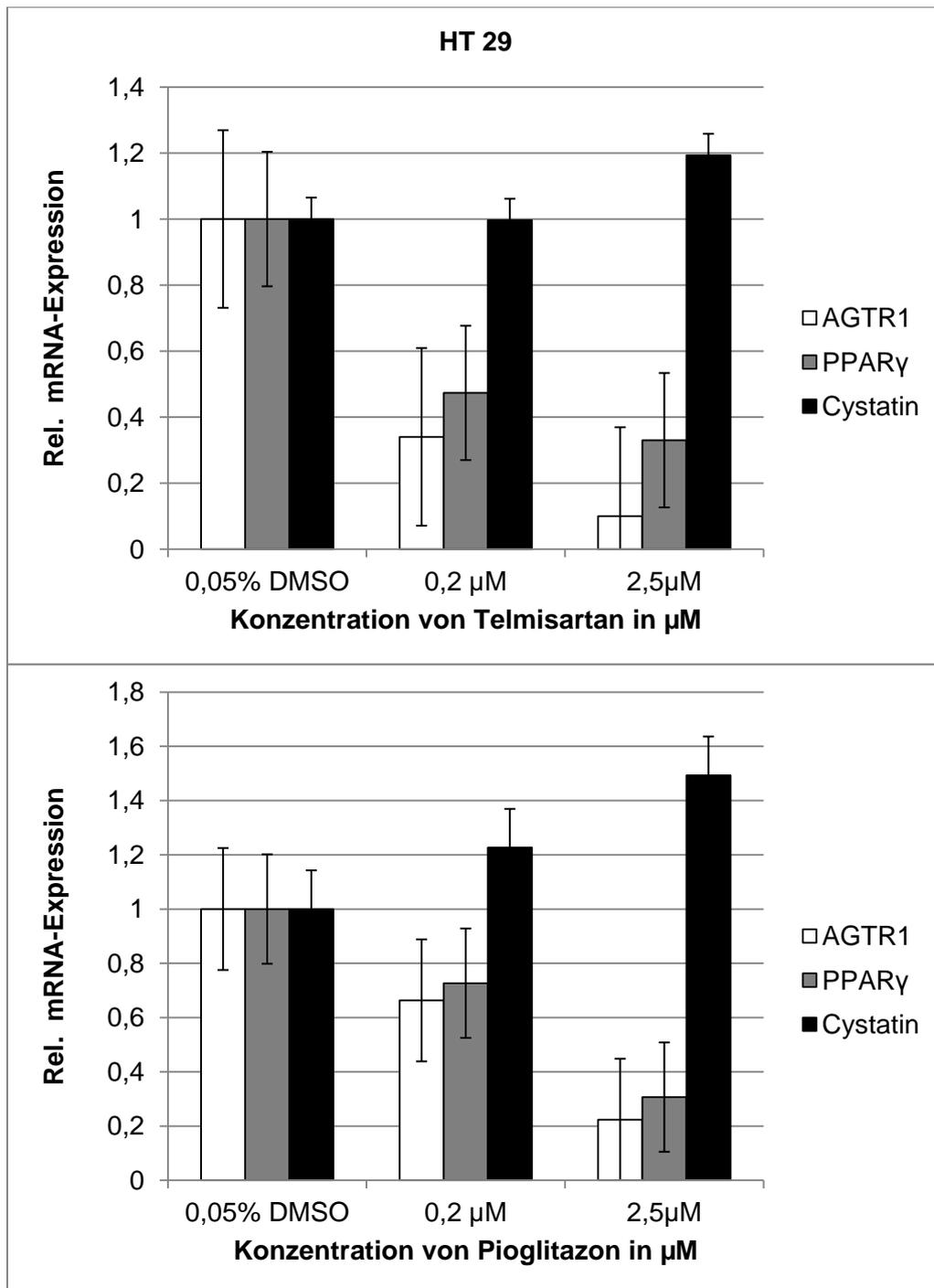


Abbildung 16: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1, PPAR- $\gamma$  und Cystatin A nach 72 Stunden Inkubationszeit der Zelllinie HT 29 mit 0,2  $\mu\text{mol/L}$  und 2,5  $\mu\text{mol/L}$  Testsubstanzen Telmisartan und Pioglitazon. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05 % DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikanten Überexpression von Cystatin A als positive Kontrolle und der Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

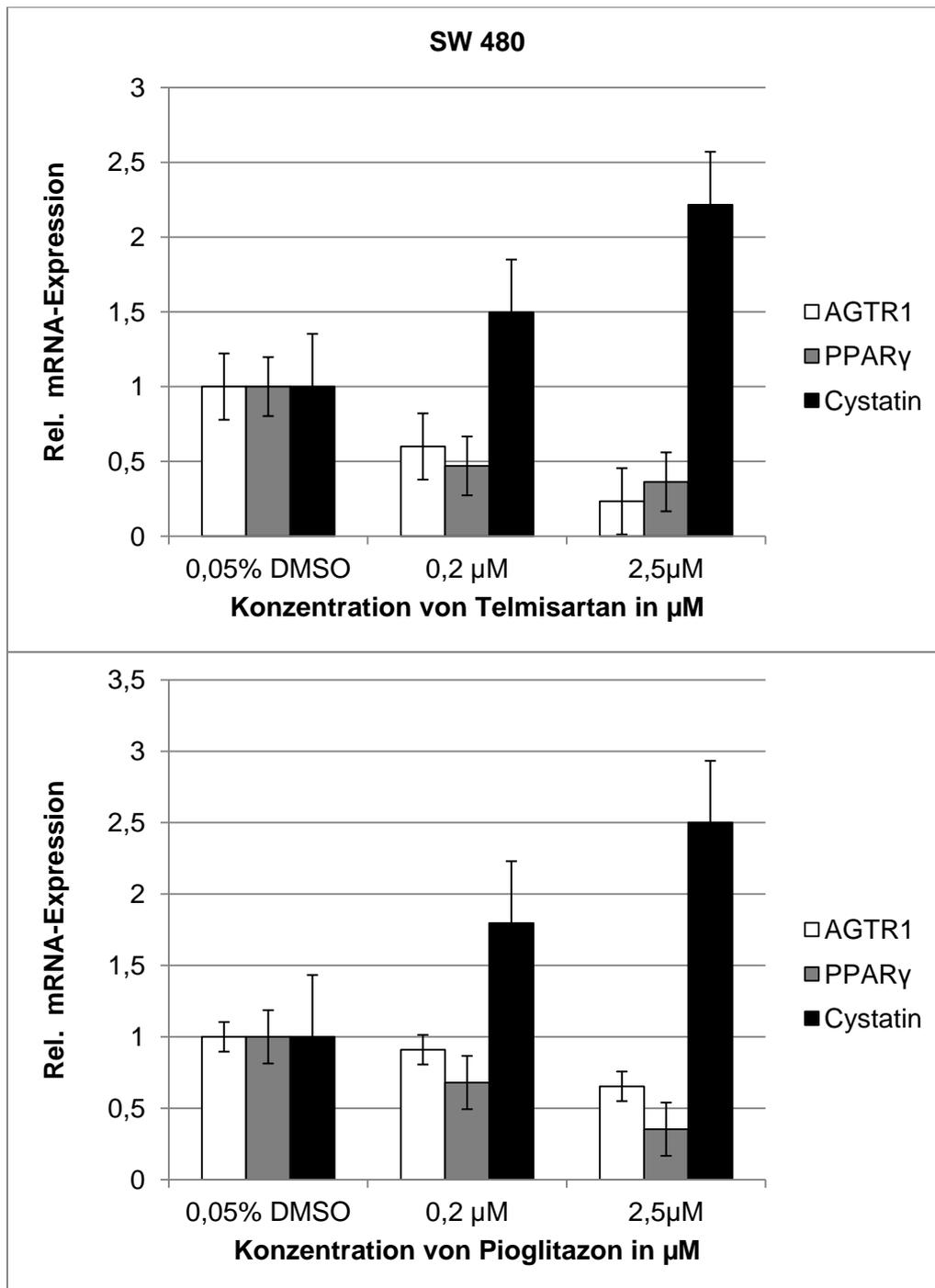


Abbildung 17: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1, PPAR- $\gamma$  und Cystatin A nach 72 Stunden Inkubationszeit der Zelllinie SW 480 mit 0,2  $\mu\text{mol/L}$  und 2,5  $\mu\text{mol/L}$  Testsubstanzen Telmisartan und Pioglitazon. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05 % DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikanten Überexpression von Cystatin A als positive Kontrolle und der Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

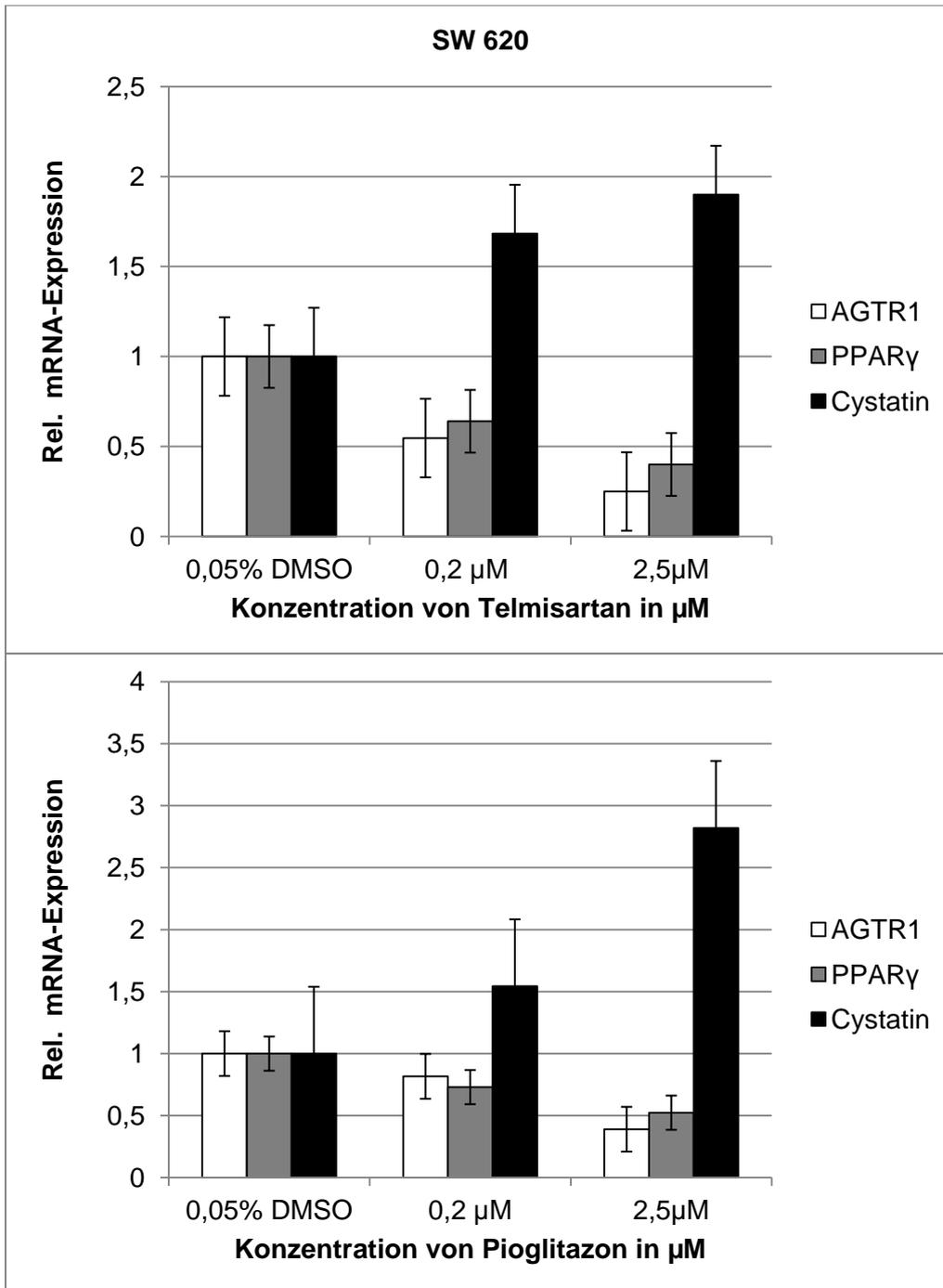


Abbildung 18: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1, PPAR- $\gamma$  und Cystatin A nach 72 Stunden Inkubationszeit der Zelllinie SW 620 mit 0,2  $\mu\text{mol/L}$  und 2,5  $\mu\text{mol/L}$  Testsubstanzen Telmisartan und Pioglitazon. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikanten Überexpression von Cystatin A als positive Kontrolle und der Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

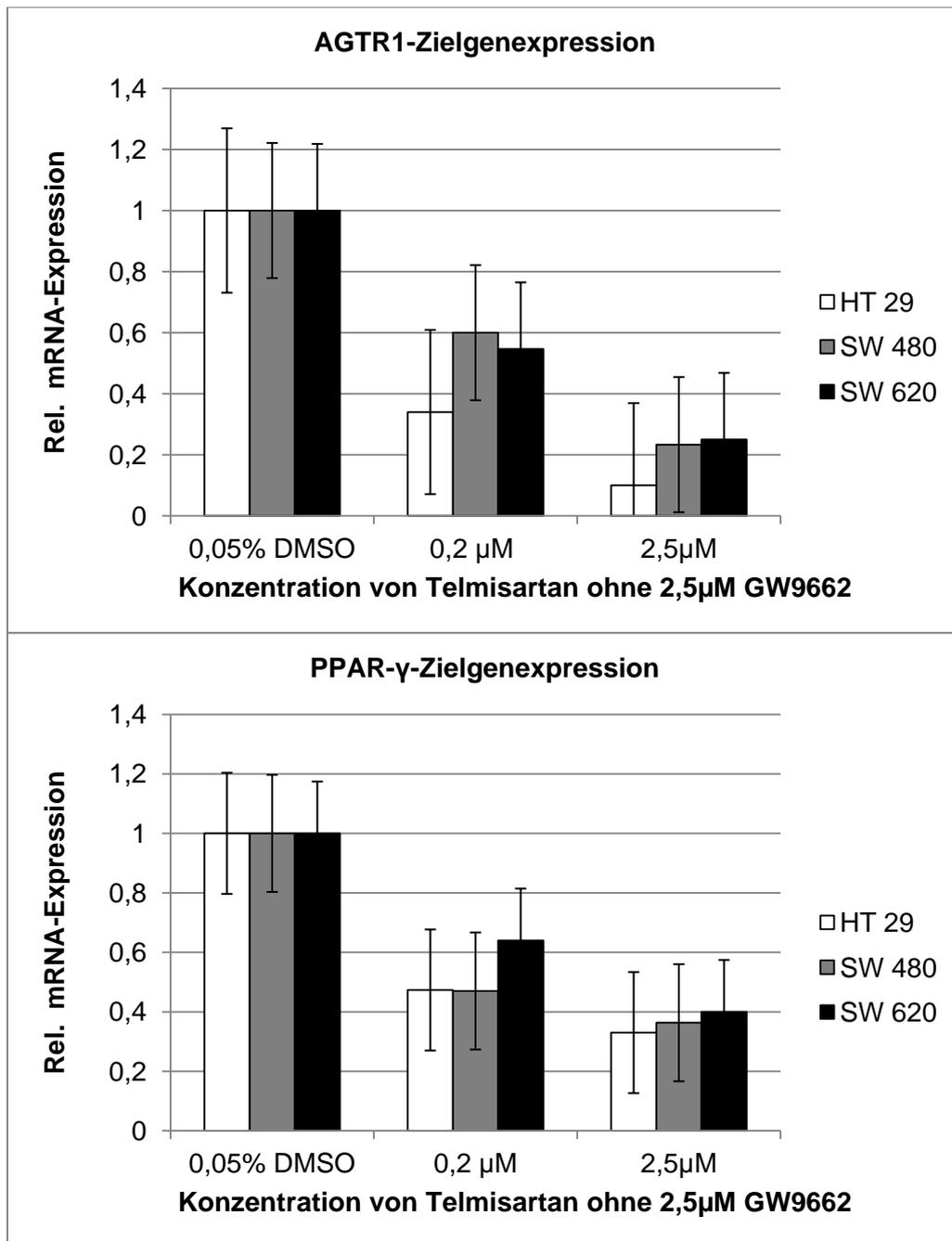


Abbildung 19: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1 im Gegensatz zu PPAR- $\gamma$  nach 72 Stunden Inkubationszeit mit 0,2 $\mu$ mol/L und 2,5 $\mu$ mol/L Telmisartan. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt ist der Mittelwert der signifikanten Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

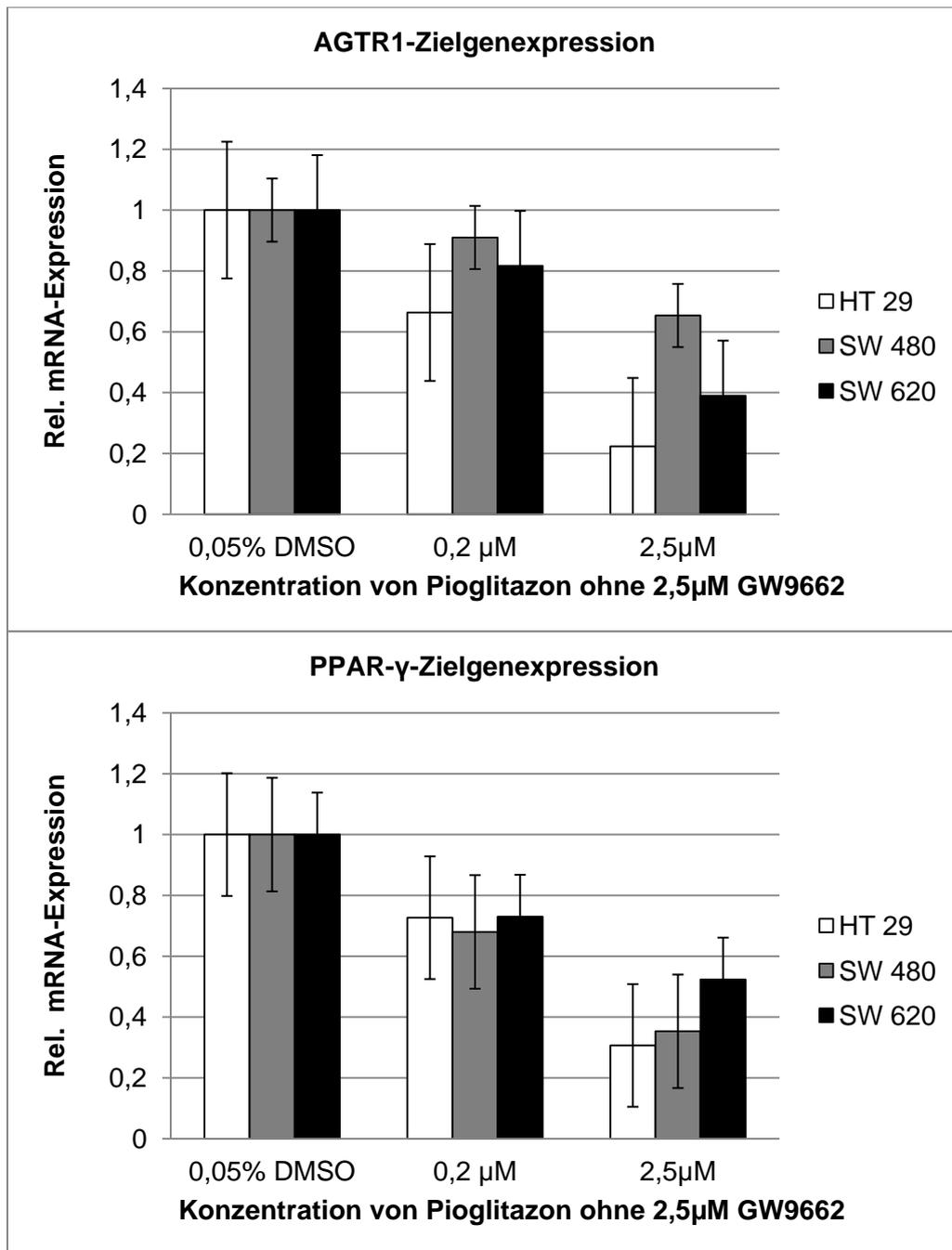


Abbildung 20: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1 im Gegensatz zu PPAR- $\gamma$  nach 72 Stunden Inkubationszeit mit 0,2  $\mu\text{mol/L}$  und 2,5  $\mu\text{mol/L}$  Pioglitazon. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt ist der Mittelwert der signifikanten Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Die Zelllinien mit 2,5µM GW9662 Vorbehandlung

In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit dem PPAR-γ-Blocker GW9662 inkubiert, sodass der PPAR-γ-Pathway gehemmt wurde und dann anschließend nach Protokoll mit den Testsubstanzen behandelt werden konnte.

Schon bei der mit 0,2 µM niedrigsten Dosis zeigte sich eine Induktion, die sich von der Nullkontrolle mit 0,05 % DMSO unterscheidet. Eine deutliche Erniedrigung der Expression war ebenfalls bei der höchsten Konzentration der Testsubstanzen festzustellen. Hierbei waren sowohl die PPAR-γ mRNA- und die AGTR 1-Expression unter Telmisartaninkubation am niedrigsten. Alle Ergebnisse sind signifikant und aus drei verschiedenen Experimenten ( $p < 0,05$ ). Cystatin wurde, wie erwartet, aus anderen Arbeiten hochreguliert aber insgesamt im Vergleich mit den Versuchen ohne GW9662 erniedrigt. AGTR1 wurde zusammenfassend verstärkt in der Expression gehemmt, insbesondere unter Telmisartaninkubation mit GW9662. PPAR-γ wurde trotz der Blockade im PPAR-γ herunterreguliert. Tabelle 5 und Abbildungen 21-25 fassen die beschriebenen Beobachtungen zur Pioglitazon- und Telmisartanwirkung auf die Expression der Zielgene in unserem Zellkulturmodell zusammen.

	Telmisartan		Pioglitazon	
	0,2 µM	2,5 µM	0,2 µM	2,5 µM
<b>HT 29</b>				
<i>AGTR1</i>	0,74	0,07	0,45	0,11
<i>PPAR-γ</i>	0,66	0,35	0,58	0,11
<b>SW 480</b>				
<i>AGTR1</i>	0,32	0,14	0,44	0,15
<i>PPAR-γ</i>	0,44	0,32	0,53	0,32
<b>SW 620</b>				
<i>AGTR1</i>	0,53	0,22	0,74	0,38
<i>PPAR-γ</i>	0,69	0,42	0,70	0,53

Tabelle 5: Eine zusammenfassende Darstellung der relativen Expression der Zielgene AGTR1 und PPAR-γ in den Zelllinien HT 29, SW 480 und SW 620 als Quotient (Mittelwert der Kontrolle vs. Mittelwert der Testsubstanzen in 0,2 und 2,5 µM)

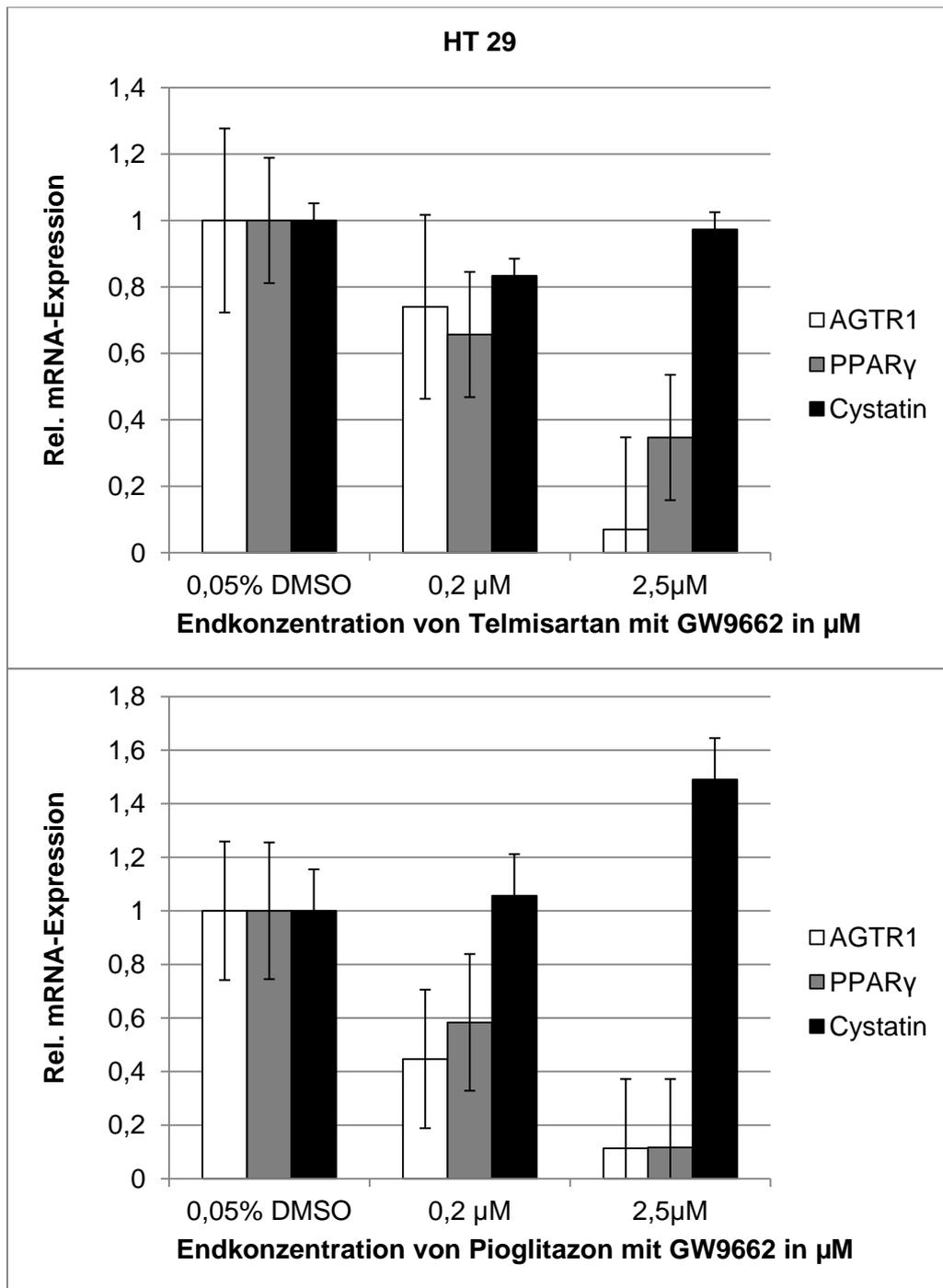


Abbildung 21: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1, PPAR- $\gamma$  und Cystatin A nach 72 Stunden Koinkubationszeit der Zelllinie HT 29 mit 0,2  $\mu$ mol/L und 2,5  $\mu$ mol/L mit den Testsubstanzen und GW9662. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikanten Überexpression von Cystatin A als positive Kontrolle und der Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

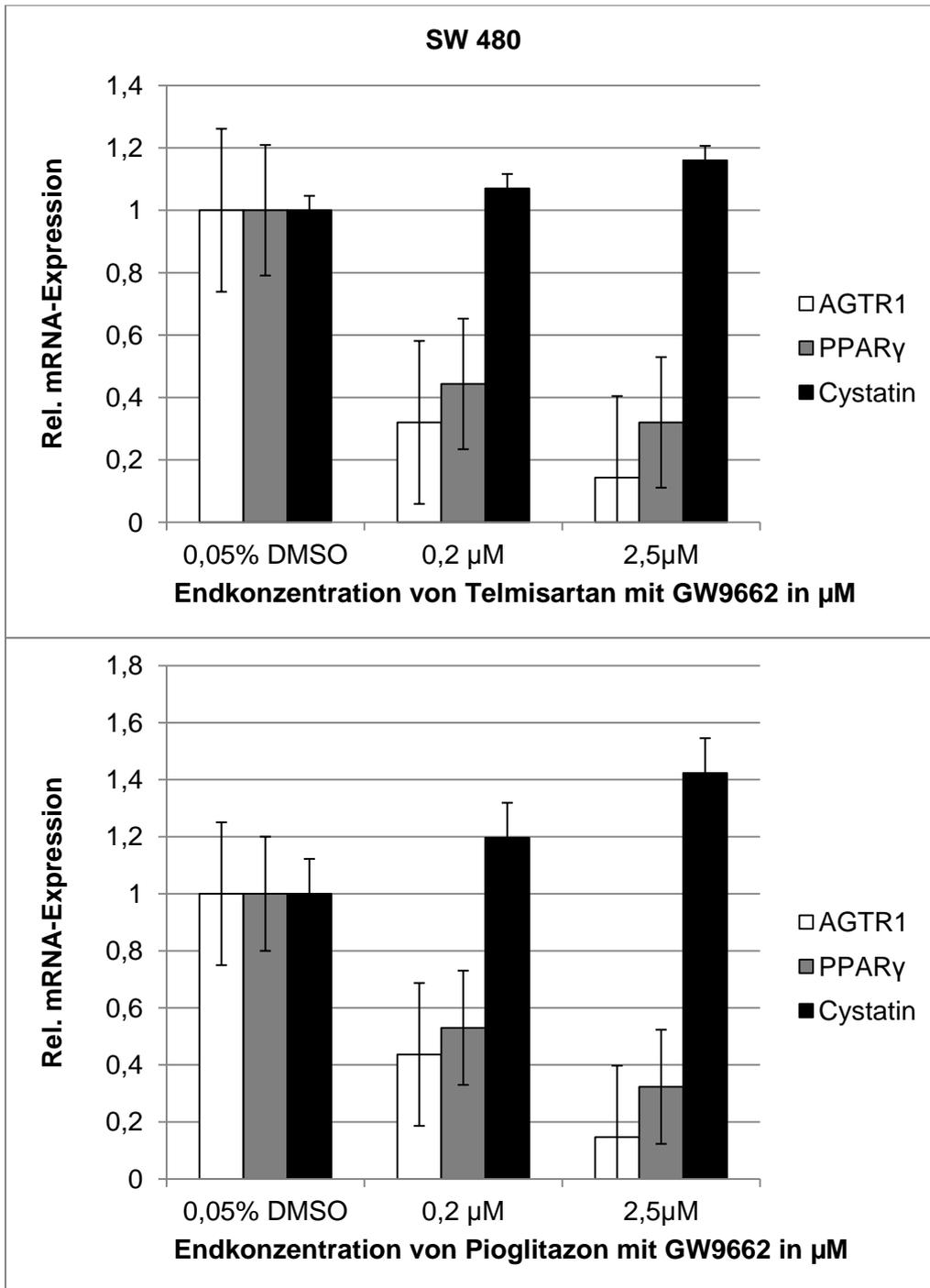


Abbildung 22: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1, PPAR- $\gamma$  und Cystatin A nach 72 Stunden Koinkubationszeit der Zelllinie SW 480 mit 0,2  $\mu$ mol/L und 2,5  $\mu$ mol/L mit den Testsubstanzen und GW9662. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression in Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikanten Überexpression von Cystatin A als positive Kontrolle und der Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

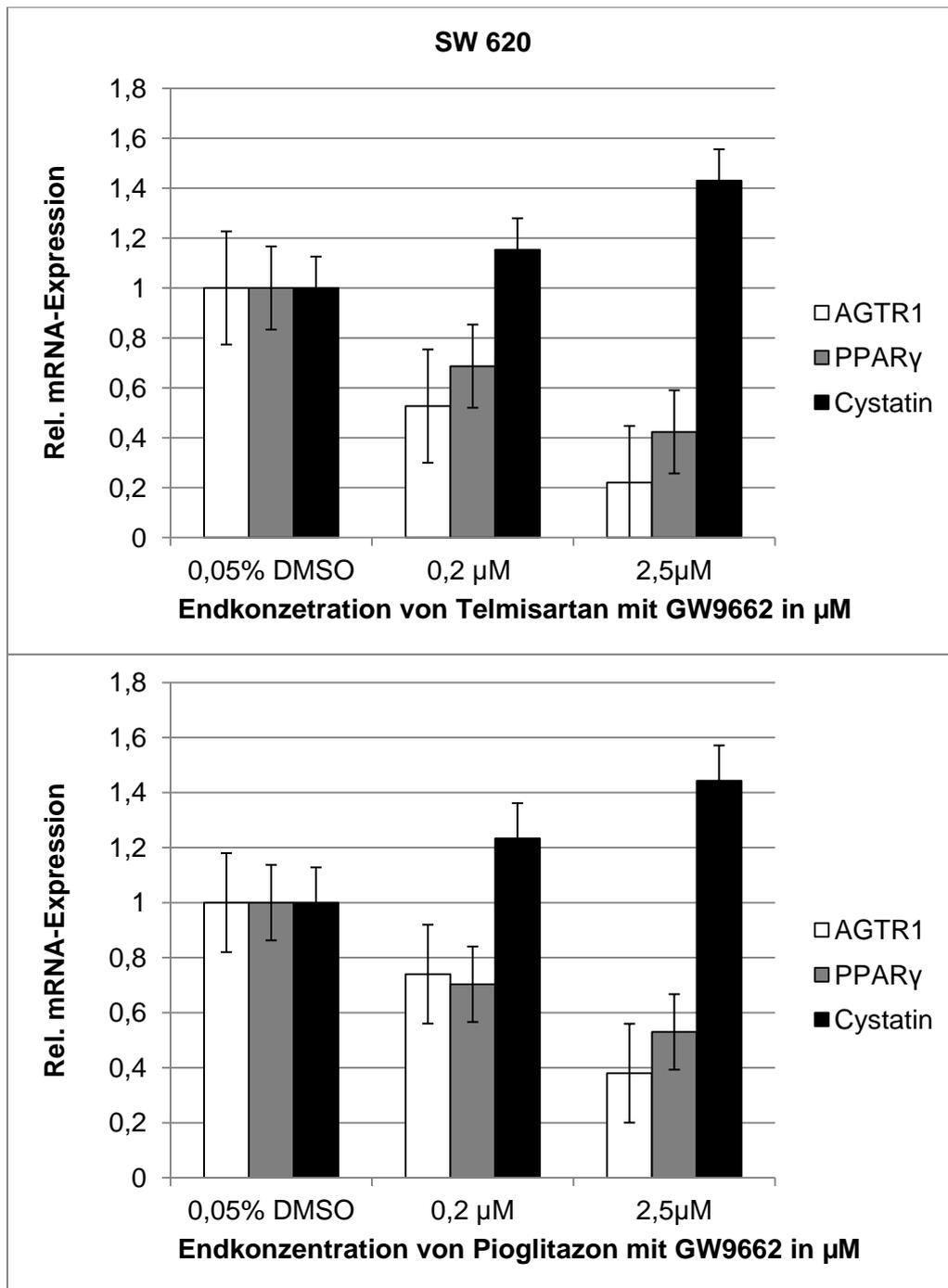


Abbildung 23: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1, PPAR- $\gamma$  und Cystatin A nach 72 Stunden Koinkubationszeit der Zelllinie SW 620 mit 0,2 $\mu\text{mol/L}$  und 2,5 $\mu\text{mol/L}$  mit den Testsubstanzen und GW9662. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression in Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte der signifikanten Überexpression von Cystatin A als positive Kontrolle und der Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

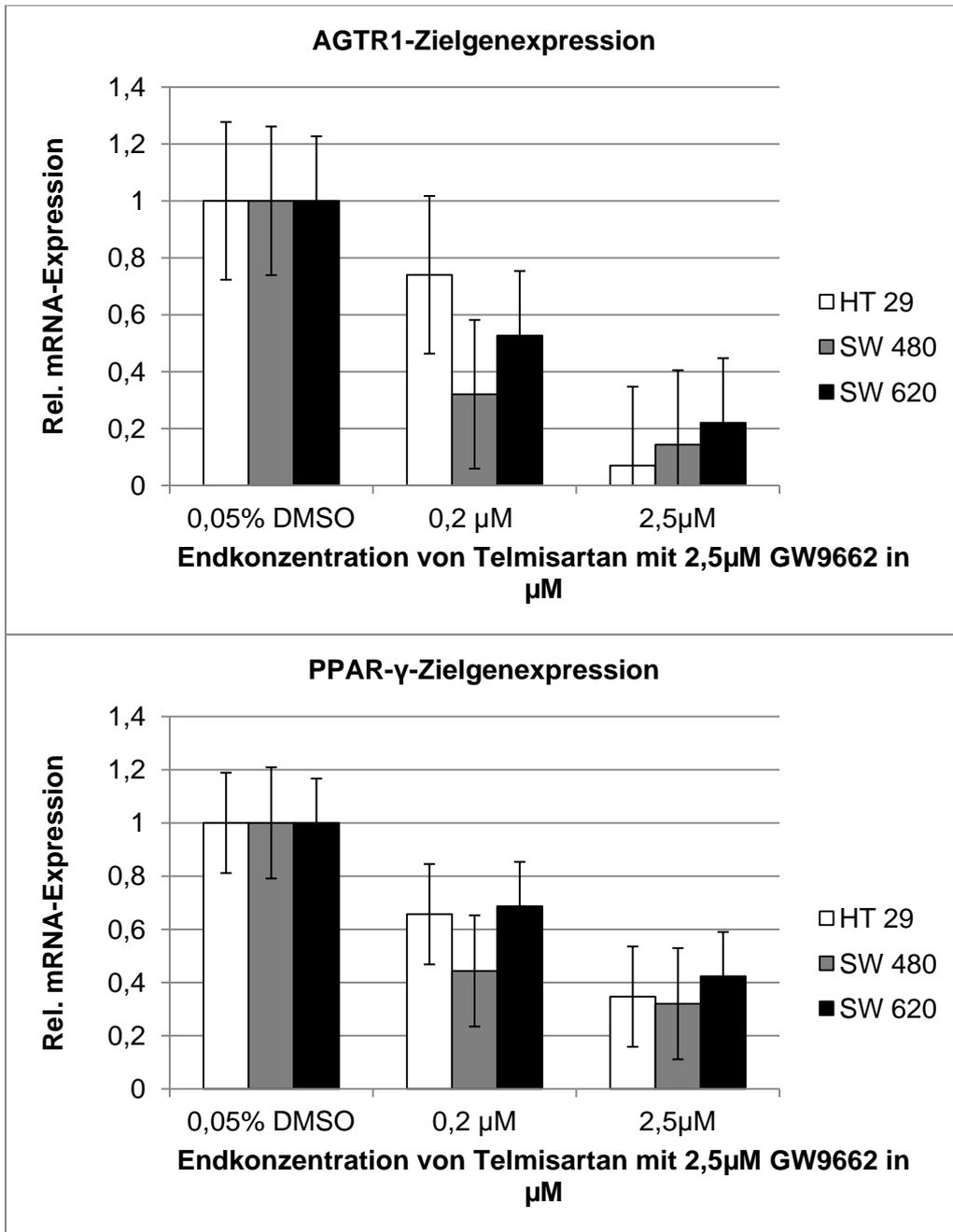


Abbildung 24: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1 im Gegensatz zu PPAR- $\gamma$  nach 72 Stunden Koinkubationszeit mit 0,2  $\mu\text{mol/L}$  und 2,5  $\mu\text{mol/L}$  Telmisartan und GW9662. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression in Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt ist der Mittelwert der signifikanten Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

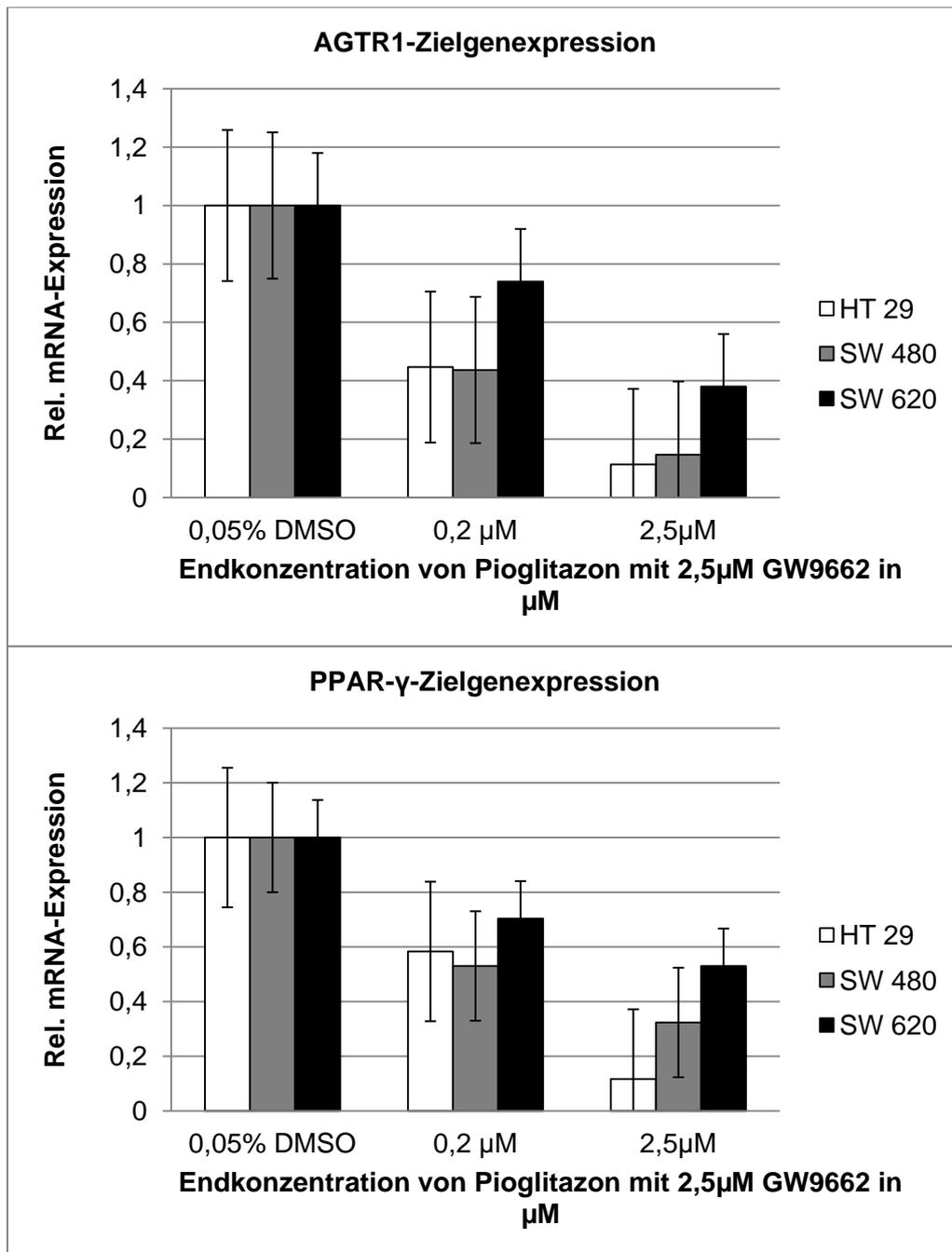


Abbildung 25: Regulation der mRNA Expression von Zielgenen AGTR1 im Gegensatz zu PPAR- $\gamma$  nach 72 Stunden Koinkubationszeit mit 0,2µmol/L und 2,5µmol/L Pioglitazon und GW9662. Die beiden Diagramme zeigen die relative mRNA Expression in Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (0,05% DMSO). Dargestellt ist der Mittelwert der signifikanten Herunterregulation von AGTR1 und PPAR- $\gamma$  aus drei unabhängigen Experimenten ( $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Deutschland nimmt tendenziell aufgrund von multimodaler Therapie ab [64]. Auch wenn die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in den letzten Jahren rückläufig zu sein scheint, ist das KRK mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 60 000 bis 70 000 Neuerkrankungen die zweit- bzw. dritthäufigste Tumorerkrankung bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland [2]. Betrachtet man die Inzidenz und Prävalenz der arteriellen Hypertonie sowie die Tatsache, dass viele Patienten deswegen Telmisartan einnehmen und dass wiederum die empfohlene Konzentration zur Behandlung der Hypertonie als selektiver partieller PPAR- $\gamma$  Agonist geeignet ist, stellt dies für unsere Arbeitshypothese einen wichtigen Anhaltspunkt dar [55].

Um die Frage unserer Arbeitshypothese zu klären, dass Telmisartan eine antiproliferative und apoptotische Wirkung über eine PPAR- $\gamma$  Aktivierung ausübt, haben wir uns für drei Zelllinien des KRK entschieden. PPAR- $\gamma$  Expression in HT 29 wurde schon in zahlreichen Arbeiten erfasst und ist gut etabliert. Sowohl SW 480 als auch SW 620 sind auf der anderen Seite noch nicht im Rahmen des PPAR- $\gamma$  untersucht worden. Deswegen haben wir zunächst die Expression von PPAR- $\gamma$  in den Zelllinien SW 480 und SW 620 mittels PCR untersucht und bestätigt. Anschließend unter Inkubation von Zelllinien HT 29, SW 480 und SW 620 mit Testsubstanzen Pioglitazon und Telmisartan, für maximal 72 Stunden MTT in den von uns gewählten Konzentrationen zwischen 0,2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M, zeigte sich eine Dosis-abhängige Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen, im Vergleich zur Inkubation mit der Kontrollsubstanz DMSO. Unser Augenmerk richtete sich auf die Wirkung der einzelnen Stoffe in 2,5  $\mu$ M, die für die menschliche Serumkonzentration nach einer oralen Einnahme gemessen, entspricht. In unseren Experimenten konnten wir bei Inkubation von HT 29 mit 2,5  $\mu$ M Pioglitazon eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen von 11,77 % ( $p < 0,05$ ) und mit Telmisartan 12,97 % ( $p < 0,05$ ) erkennen. Bei Wiederholungen der Experimente mit SW 480 konnten wir eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen von 13,48% ( $p < 0,05$ ) für Pioglitazon und 8,11 % ( $p < 0,05$ ) für Telmisartan zeigen. In SW 620 Zelllinien beobachteten wir eine Senkung der Lebensfähigkeit von 10,39 % ( $p < 0,05$ ) mit Pioglitazon und 14,18 % ( $p < 0,05$ ) mit Telmisartan.

Um zu untersuchen, ob der wachstumshemmende Effekt von Testsubstanzen auf Tumorzelllinien unabhängig von der PPAR- $\gamma$  Aktivierung ist, wurden die vorbehandelten Zelllinien für 72 Stunden mit einem bereits etablierten PPAR- $\gamma$  Antagonist GW9662 vorbehandelt. In den Experimenten zur Untersuchung des PPAR- $\gamma$  unabhängigen antiproliferativen Effekts ist die Anwendung des Inhibitors GW9662 notwendig. GW9662 ist ein synthetischer irreversibler PPAR- $\gamma$  Antagonist, der an die LBD am Rezeptor bindet. Diese Bindung verhindert sowohl die Bindung der natürlichen als auch synthetischen Liganden an

die LBD. In unseren Experimenten konnten wir bei Koinkubation von HT 29 mit 2,5  $\mu$ M Pioglitazon und GW9662 eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen von 4,25 % ( $p < 0,05$ ) und mit Telmisartan 14,26 % ( $p < 0,05$ ) erkennen. Bei Wiederholungen der Experimente mit SW 480 konnten wir eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen von 10,70% ( $p < 0,05$ ) für Pioglitazon und 18,17 % ( $p < 0,05$ ) für Telmisartan zeigen. In SW 620 Zelllinien beobachteten wir eine Senkung der Lebensfähigkeit von 14,08 % ( $p < 0,05$ ) mit Pioglitazon und 24,81 % ( $p < 0,05$ ) mit Telmisartan. Pioglitazon vermittelt bei allen vorbehandelten Zelllinien eine Abnahme vitaler wachsender Zellen bei zunehmenden Konzentrationen trotz der Wirkung des selektiven PPAR- $\gamma$ -Blockers, GW9662. In unseren Zellkulturexperimenten lässt sich durch den Einsatz von Pioglitazon in Kombination mit GW9662 eine geringere Wachstumshemmung bei allen Zelllinien beobachten. Ein deutlich verstärkter Effekt konnte durch Telmisartan auf die Zellproliferation und Apoptoseinduktion der Zelllinien beobachtet werden. In dieser Übersichtsarbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Wirkung von Telmisartan in Kombination mit GW9662 über die Einzelwirkung von Telmisartan hinaus verstärkte. Die Koinkubation beider Wirkstoffe zeigte eine Wirkungsverstärkung schon bei 2,5  $\mu$ M.

Die deutlich starke antiproliferative Wirkung der Testsubstanzen konnten wir in unserem Zellkulturmodell mit Zellzählung quantifizieren. Diese Wirkung von Telmisartan bei 2,5  $\mu$ M in einer Zellenzahl nach nur 24 Stunden Inkubationszeit und mehreren PBS-Waschungen zeigte 31,59 % in HT 29 ( $p < 0,05$ ), 44,21% in SW 480 ( $p < 0,05$ ) und 42,58 % in SW 620 ( $p < 0,05$ ). Mit Pioglitazon waren es dagegen 24,28 % in HT 29 ( $p < 0,05$ ), 40,23% in SW 480 ( $p < 0,05$ ) und 40,61 % in SW 620 ( $p < 0,05$ ). Inbetrachtziehung des nachgewiesenen partiellen PPAR- $\gamma$  Agonismus von Telmisartan, erwarten wir eine Abnahme der Proliferation um die Hälfte der von Pioglitazon. Eine physiologische Serumkonzentration von 2,5  $\mu$ M Telmisartan löste eine deutliche Apoptose aus. Überraschenderweise scheint die Potenz der partiellen PPAR- $\gamma$  Agonisten Telmisartan noch größer, als die vollen PPAR- $\gamma$  Agonisten Pioglitazon zu sein.

In weiteren Inkubationsexperimenten, mit einer Kombination beider Substanzen mit GW9662, ließ sich bei der Zellzählung des Zellwachstums beobachten, was die oben genannten MTT Ergebnisse untermauerten. In unseren Experimenten konnten wir bei Koinkubation von HT 29 mit 2,5  $\mu$ M Pioglitazon und GW9662 eine Reduktion der Proliferation der Zellen von 30,17 % ( $p < 0,05$ ), und mit Telmisartan 40,73 % ( $p < 0,05$ ) erkennen. Bei Wiederholungen der Experimente mit SW 480 konnten wir eine Reduktion der Proliferation der Zellen von 40 88% ( $p < 0,05$ ) für Pioglitazon und 44,70 % ( $p < 0,05$ ) für Telmisartan zeigen. In SW 620 Zelllinien beobachteten wir eine Senkung der Lebensfähigkeit von 37,69 % ( $p < 0,05$ ) mit Pioglitazon und 37,60 % ( $p < 0,05$ ) mit Telmisartan.

Wir haben mittels Caspase-3/7 Assay untersucht, ob die Inkubation der Testsubstanzen zu der weit vorgeschlagenen Apoptose führt. Die Caspase-3/7- Aktivität wurde luminometrisch bestimmt. Unter 2,5  $\mu\text{M}$  Telmisartaninkubation lag die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen auf 2,82; bei den SW 480 Zellen auf 4,98 und bei den SW 620 auf 8,45. Unter einer Einzelinkubation mit 2,5  $\mu\text{M}$  Pioglitazon lag die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen auf 1,71 bei den SW 480 Zellen auf 3,07 und bei den SW 620 auf 9,11. Die drei Zelllinien zeigten hierbei im Vergleich zur Kontrollbedingung nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 2,5  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Anstieg der Caspase-Aktivität ( $p < 0,05$ ). Wir konnten in unserem Zellkulturmodell zeigen, dass sowohl Pioglitazon als auch Telmisartan die Apoptose durch die Aktivierung der Effektor Caspasen 3 und 7 signifikant induzieren. Interessanterweise zeigt Telmisartan eine relativ vergleichbare, wenn nicht höhere pro-apoptotische Wirkung.

Kultiviert man die mit Testsubstanzen behandelten Zellen unter Ausschluss von GW9662, so kommt es zu einem Anstieg von Effektor Caspasen 3 und 7 mit darauffolgender Apoptose. Kultiviert man allerdings die mit Testsubstanzen behandelten Zellen mit PPAR- $\gamma$  Blocker GW9662, so kommt es ebenso zu einem Anstieg von Caspasen 3 und 7, aber mit insgesamt geringerem Spiegel. Unter 2,5  $\mu\text{M}$  Telmisartaninkubation mit GW9662 lag die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen auf 2,30; bei den SW 480 Zellen auf 4,26 und bei den SW 620 auf 4,04. Unter einer Koinkubation von 2,5  $\mu\text{M}$  Pioglitazon mit GW9662 lag die relative Caspase Aktivität bei den HT 29 Zellen auf 2,62 bei den SW 480 Zellen auf 3,33 und bei den SW 620 auf 7,10. Es scheint also, als ob es verschiedene biochemische Mechanismen (Pathways) für die Induktion von Apoptose durch das Entziehen bzw. Zusetzen von GW9662 zu den Zellen geben könnte. Unter Telmisartaninkubation mit GW9662 kam es im Vergleich zur Pioglitazoninkubation mit GW9662 zu einer verstärkten Veränderung in der Caspase Aktivität in allen Zellen. Interessant scheint uns die Beobachtung, dass trotz der PPAR- $\gamma$  Blockade unter Pioglitazoninkubation die Caspase Aktivität leicht anstieg. Diese Apoptose-induktion wird demnach nicht nur über die von uns untersuchten Pathway der Apoptose-regulation vermittelt.

Führt die Behandlung mit Pioglitazon und Telmisartan zu einer Änderung der mRNA Expression der Zielgene PPAR- $\gamma$  und AGTR1?

Durch die Zugabe von PPAR- $\gamma$  Agonisten wird PPAR- $\gamma$  aktiviert und dadurch charakteristisch auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Um zu zeigen, dass PPAR- $\gamma$  tatsächlich in unseren Zelllinien aktiviert wurde, untersuchten wir Cystatin A als Positivkontrolle mittels Real Time PCR. Cystatin A ist ein etabliertes Zielgen des PPAR- $\gamma$ , das durch Liganden-Aktivierung des PPAR- $\gamma$  hochreguliert wird. Unter 72 Stunden Inkubationszeit mit Pioglitazon und Telmisartan kam es zu einer Expressionsminderung von PPAR- $\gamma$  und AGTR1 in unseren

Zelllinien. AGTR1 wurde dabei noch deutlich verstärkt als PPAR- $\gamma$  herunterreguliert. Gleichzeitig kam es zu einer Expressionszunahme von Cystatin.

Bei Koinkubation der Zellen in Telmisartan und GW9662 kam es zu einer beträchtlich verstärkten Hemmung der Zellproliferation in unserem Zellkulturmodell. Beim Vergleich des Wachstums unter Telmisartan und der Kombination mit GW9662 ließ sich eine proliferationshemmende Wirkung der Kombination feststellen, welche deutlicher als unter der Einzelinkubation ausfiel. Dies spiegelte sich ebenso bei der Expression der Zielgene wider. Die Kombination von Testsubstanz mit GW9662 senkt die PPAR- $\gamma$  und AGTR1 Expression genauso wie bei Einzelinkubation, wobei AGTR1 noch verstärkt als PPAR- $\gamma$  herunterreguliert wird. Unter einer Koinkubation mit GW9662 kommt es bei beiden Testsubstanzen zu einer signifikanten Verstärkung der Expressionsminderung von AGTR1 im Vergleich zu PPAR- $\gamma$ . Cystatin wird wie erwartet aus anderen Arbeiten hochreguliert, aber insgesamt im Vergleich mit den Versuchen ohne GW9662 erniedrigt. AGTR1 wird insbesondere unter Telmisartaninkubation mit GW9662 zusammenfassend verstärkt in der Expression gehemmt. PPAR- $\gamma$  wird trotz der Blockade im PPAR- $\gamma$  herunterreguliert. Diese starke Telmisartanwirkung deutet daraufhin, dass andere Mechanismen außer PPAR- $\gamma$  vorhanden sein müssen. Ob eine Wirkungsverstärkung durch das lokale Angiotensin II System oder weitere PPAR- $\gamma$  unabhängige Mechanismen sowie Liganden-unabhängige PPAR- $\gamma$  Aktivierung eine Rolle spielt, bleibt in dieser Arbeit offen. Studien mit PPAR- $\gamma$  negativen Zellen oder vorbehandelten Zellen mit PPAR- $\gamma$  Antagonisten belegten bereits PPAR- $\gamma$  unabhängige Mechanismen [65, 66]. Mögliche unabhängige antiproliferative und apoptotische Effekte von GW9662 sollten auch in weiteren Studien untersucht werden.

Ein partieller PPAR- $\gamma$  Agonismus wurde für alle bekannten zugelassenen ARB, mit Ausnahme von Losartan, in 3T3-L1 Präadipozyten beschrieben, die zu einer metabolischen Veränderung und Zelldifferenzierung führt [30]. Viele wissenschaftliche Arbeiten haben die antiproliferative Wirkung von dem Antidiabetikum Pioglitazon in vitro bei Kolorektalkarzinom-Zelllinien beschrieben [35, 46-50, 67]. In den durchgeführten Zellkulturexperimenten konnten wir die Ergebnisse zahlreicher Arbeitsgruppen bestätigen und erweitern. Es konnte gezeigt werden, dass Telmisartan PPAR- $\gamma$  in Konzentrationen, vergleichbar im menschlichen Serum nach oraler Einnahme, aktiviert. Die PPAR- $\gamma$  Aktivierung auf Telmisartaninkubation führt zu einer erheblichen Proliferationshemmung und induziert Apoptose in unserem Zellkulturmodell. Überraschenderweise konnten wir zeigen, dass Telmisartan Merkmale eines vollen PPAR- $\gamma$  Agonisten aufweist. Da Telmisartan nicht als der typische PPAR- $\gamma$  Agonist etabliert ist und ob Telmisartan bestimmte Wirkungen durch alternative molekulare Mechanismen ausübt, werden in weiteren Untersuchungen beantwortet.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das kolorektale Karzinom bleibt in der Bundesrepublik trotz rückläufiger Inzidenz weiterhin eines der häufigsten Tumorerkrankungen bei beiden Geschlechtern. Trotz standardisierter multimodaler Therapiekonzepte und steigendem Verständnis der molekularen tumorpathogenese stirbt immer noch nahezu die Hälfte aller Patienten in Folge der Erkrankung. Bei aktuell prognostisch nahezu ausgereizten chirurgischen Therapiestrategien stellt die Identifikation und Validierung neuer molekularer Ansatzpunkte für eine medikamentöse Tumortherapie eine der Herausforderungen für die Tumorforschung dar.

PPAR- $\gamma$  gehört zusammen mit 2 anderen Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , zur Familie der NR und greift als Transkriptionsfaktor in verschiedenste Stoffwechselprozesse ein. Zurzeit sind verschiedene PPAR- $\gamma$  Liganden bekannt. Pioglitazon ist bereits in klinischer Anwendung zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 zu finden. Diese Substanz übt ebenfalls antineoplastische Effekte durch die hemmende Wirkung auf PPAR- $\gamma$  Rezeptoren in Zelllinien verschiedener Krebsarten aus. Zahlreiche experimentelle Arbeiten schreiben dem ARB Telmisartan eine selektive partielle agonistische Funktion auf PPAR- $\gamma$  Liganden zu. Aktuelle präklinische Studien deuten darauf hin, dass der ARB Telmisartan in empfohlenen Konzentrationen zur Behandlung der Hypertonie als selektiver partieller PPAR- $\gamma$  Agonist zu betrachten ist. Diese Konzentrationen sind sogar mit oralen Dosen erreichbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Telmisartan auf die Proliferation und Apoptose von humanen Kolorektalenkarzinomzelllinien nachzuweisen. Anschließend wurden im zweiten Schritt die Ergebnisse von Telmisartan mit Pioglitazon verglichen. Es konnte der Einfluss von Telmisartan und Pioglitazon auf die Proliferation und Apoptose von humanen Kolorektalkarzinomzelllinien gezeigt werden. Um die Effekte zu untersuchen, wurden zellbiologische und molekularbiologische Methoden durchgeführt. Sowohl unter Pioglitazon- als auch unter Telmisartaninkubation kam es zu einer dosisabhängigen Wachstumshemmung aller untersuchten Zelllinien in MTT Assay und Zellzählungsexperimenten. Dabei zeigte sich, dass dieser Effekt durch Telmisartan deutlich stärker als bei Pioglitazon, einem PPAR- $\gamma$  Vollagonisten, ausgeprägt war. Bei der Inkubation der Zellen mit einer Kombination von Pioglitazon und GW9662, ein selektiver PPAR- $\gamma$  Blocker, wurde der antiproliferative Effekt der Einzelsubstanz deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu wurde bei der Inkubation der Zellen mit einer Kombination von Telmisartan und GW9662 eine Verstärkung des antiproliferativen Effekts festgestellt. Weiterhin induzierten Pioglitazon und Telmisartan über einen Anstieg der Aktivität der Effektor Caspasen 3 und 7, eine Apoptose in den von uns untersuchten Kolonrektalkarzinomzellen. Bei Inkubation mit der Pioglitazon-GW9662-Kombination bzw. Telmisartan-GW9662-

Kombination kam es auch zu einer Verstärkung der Apoptoseinduktion, aber insgesamt auf einem niedrigen Spiegel. Zudem konnte gezeigt werden, dass es unter Telmisartaninkubation mit GW9662 im Vergleich zur Pioglitazoninkubation mit GW9662 zu einer verstärkten Veränderung in der Caspase Aktivität kam. Interessant scheint uns die Beobachtung, dass trotz der PPAR- $\gamma$  Blockade unter Pioglitazoninkubation die Caspase Aktivität leicht anstieg. Diese Apoptoseinduktion wird demnach nicht nur über die von uns untersuchten Pathway der Apoptoseregulation vermittelt. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um diese Verstärkung der Wirkung auf die Apoptoseinduktion näher zu charakterisieren. Hierzu könnten eventuell ein PPAR- $\gamma$  unabhängiger Mechanismus oder Liganden-unabhängige PPAR- $\gamma$  Aktivierung eine Rolle spielen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Änderung von mRNA Expression der Zielgene PPAR- $\gamma$  und AGTR1 zu untersuchen. Unter 72 Stunden Inkubationszeit mit Pioglitazon und Telmisartan kam es zu einer Expressionsminderung von PPAR- $\gamma$  und AGTR1 in unseren Zelllinien. AGTR1 wurde dabei noch deutlich verstärkt als PPAR- $\gamma$  herunterreguliert. Gleichzeitig kam es zu einer Expressionszunahme von Cystatin. Diese Beobachtung konnte auch durch die Koinkubation mit GW9662 noch bestätigt werden.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse das antitumorogene Potential von PPAR $\gamma$ -Liganden bei Kolonkarzinomzellen. Bisher ist Pioglitazon als ein PPAR- $\gamma$  Vollagonist und Telmisartan als ein partieller PPAR- $\gamma$  Agonist bekannt. Unsere Daten zeigen jedoch, dass Telmisartan einen noch stärkeren antiproliferativen Effekt als Pioglitazon hat. Dieser Effekt wird vermutlich durch alternative molekulare Mechanismen vermittelt, die mit einer verminderten Expression der Zielgene PPAR- $\gamma$  und AGTR1 sowie einer Hochregulation von Cystatin A einhergehen. Die Aktivierung von PPAR- $\gamma$  stellt somit einen weiteren potentiellen Ansatz zur Tumorbehandlung dar. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen sollten neben der Untersuchung auf alternative Aktivierungsmechanismen von Telmisartan der Einfluss einer Kombinationsbehandlung mit dem Vollagonisten Pioglitazon und dem partiellen PPAR- $\gamma$  Agonisten Telmisartan auf Kolonkarzinomzellen in weiteren Studien analysiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Gryfe R. Inherited colorectal cancer syndromes. Clin Colon Rectal Surg. 2009 Nov;22(4):198-208. PubMed PMID: 21037810. Pubmed Central PMCID: 2796102. Epub 2010/11/03. eng.
2. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S. Krebs in Deutschland 2009/2010, Häufigkeiten und Trends - Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 9. Ausgabe ed. Berlin: Robert Koch-Ins.; 2013. 150 S. p.
3. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. Gut. 2012 Jun;61(6):847-54. PubMed PMID: 22427238. Pubmed Central PMCID: 3345105.
4. GLOBOCAN, IARC(WHO). Most Frequent Cancers in Germany, both sexes 2008 [Mittwoch, 1. Juni 2011 14:31:14]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=276>.
5. Husmann G. Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends - Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Ausg. ed. Berlin: Robert Koch-Inst.; 2010. 120 S. p.
6. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2007 Mar;18(3):581-92. PubMed PMID: 17287242. Epub 2007/02/09. eng.
7. GLOBOCAN, IARC(WHO). Colorectal Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012 Summary 2012 [Monday, 5. October 2015 11:05:36]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal#](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal#).
8. Chan KK, Dassanayake B, Deen R, Wickramarachchi RE, Kumarage SK, Samita S, et al. Young patients with colorectal cancer have poor survival in the first twenty months after operation and predictable survival in the medium and long-term: analysis of survival and prognostic markers. World J Surg Oncol. 2010;8:82. PubMed PMID: 20840793. Pubmed Central PMCID: 2954852. Epub 2010/09/16. eng.
9. Chien C, Morimoto LM, Tom J, Li CI. Differences in colorectal carcinoma stage and survival by race and ethnicity. Cancer. 2005 Aug 1;104(3):629-39. PubMed PMID: 15983985.
10. Mojica CM, Glenn BA, Chang C, Bastani R. The Relationship between Neighborhood Immigrant Composition, Limited English Proficiency, and Late-Stage Colorectal Cancer Diagnosis in California. BioMed research international. 2015;2015:460181. PubMed PMID: 26504808. Pubmed Central PMCID: 4609354.
11. Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. Maturitas. 2015 Mar;80(3):258-64. PubMed PMID: 25619144.

12. Hawkins NA, Berkowitz Z, Rodriguez JL. Awareness of Dietary and Alcohol Guidelines Among Colorectal Cancer Survivors. *American journal of preventive medicine*. 2015 Dec;49(6 Suppl 5):S509-17. PubMed PMID: 26590646.
13. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*. 2015 Oct 23. PubMed PMID: 26514947.
14. Zhu Y, Wu H, Wang PP, Savas S, Woodrow J, Wish T, et al. Dietary patterns and colorectal cancer recurrence and survival: a cohort study. *BMJ open*. 2013;3(2). PubMed PMID: 23396503. Pubmed Central PMCID: 3586110.
15. Tantamango YM, Knutsen SF, Beeson WL, Fraser G, Sabate J. Foods and food groups associated with the incidence of colorectal polyps: the Adventist Health Study. *Nutr Cancer*. 2011 May;63(4):565-72. PubMed PMID: 21547850. Epub 2011/05/07. eng.
16. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathology research international*. 2012;2012:509348. PubMed PMID: 22888469. Pubmed Central PMCID: 3409552.
17. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014;1(6):400-6. PubMed PMID: 25594038. Pubmed Central PMCID: 4284625.
18. Kennedy EP, Hamilton SR. Genetics of colorectal cancer. *Semin Surg Oncol*. 1998 Sep;15(2):126-30. PubMed PMID: 9730419. Epub 1998/09/08. eng.
19. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer*. 2008;7(1):27-39. PubMed PMID: 17999161. Epub 2007/11/14. eng.
20. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997 Sep-Oct;21(5):233-300. PubMed PMID: 9438104. Epub 1998/01/23. eng.
21. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*. 2012 Jan;5(1):19-27. PubMed PMID: 22574233. Pubmed Central PMCID: 3348713.
22. Bosman FT, Carneiro F, International Agency for Research on C. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Reprinted ed. Lyon: IARC Press; 2010. 417 S. p.
23. Bujanda L, Cosme A, Gil I, Arenas-Mirave JI. Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 7;16(25):3103-11. PubMed PMID: 20593495. Pubmed Central PMCID: 2896747.
24. Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis*. 2010;28(4-5):619-24. PubMed PMID: 21088413. Epub 2010/11/20. eng.
25. Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heussner P, et al. [S3-guideline colorectal cancer version 1.0]. *Z Gastroenterol*. 2013 Aug;51(8):753-854. PubMed

PMID: 23955142. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 - Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL.

26. Chen SL, Steele SR, Eberhardt J, Zhu K, Bilchik A, Stojadinovic A. Lymph node ratio as a quality and prognostic indicator in stage III colon cancer. *Ann Surg*. 2011 Jan;253(1):82-7. PubMed PMID: 21135690.
27. Kroker AJ, Bruning JB. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPARgamma Partial Agonism. *PPAR Res*. 2015;2015:816856. PubMed PMID: 26435709. Pubmed Central PMCID: 4578752.
28. Kota BP, Huang TH-W, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 2005;51(2):85-94.
29. Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPARgamma in humans. *Mol Genet Metab*. 2004 Sep-Oct;83(1-2):93-102. PubMed PMID: 15464424. Epub 2004/10/07. eng.
30. Schupp M. Identifizierung und Charakterisierung von AT 1 -Antagonisten als PPAR-gamma-Liganden 2005. V, 134 Bl. p.
31. Rumi MA, Ishihara S, Kazumori H, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Can PPAR gamma ligands be used in cancer therapy? *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004 Nov;4(6):465-77. PubMed PMID: 15579013. Epub 2004/12/08. eng.
32. Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)[ggr] in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR[ggr] agonists. *Br J Cancer*. 2000;83(10):1394-400.
33. Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPAR[gamma] inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Letters*. 1999;455(1-2):135-9.
34. Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*. 2002 May;50(5):658-64. PubMed PMID: 11950812. Pubmed Central PMCID: 1773196. Epub 2002/04/16. eng.
35. Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res*. 1999 Jan;90(1):75-80. PubMed PMID: 10076568. Epub 1999/03/17. eng.
36. Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR[ggr]. *Nat Med*. 1998;4(9):1046-52.
37. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, et al. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1058-61. PubMed PMID: 9734400. Epub 1998/09/12. eng.

38. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med.* 1998 Sep;4(9):1053-7. PubMed PMID: 9734399. Epub 1998/09/12. eng.
39. Eibl G, Wente MN, Reber HA, Hines OJ. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor [gamma] Induces Pancreatic Cancer Cell Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001;287(2):522-9.
40. Elnemr A, Ohta T, Iwata K, Ninomia I, Fushida S, Nishimura G, et al. PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2000 Dec;17(6):1157-64. PubMed PMID: 11078801. Epub 2000/11/18. eng.
41. Itami A, Watanabe G, Shimada Y, Hashimoto Y, Kawamura J, Kato M, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer.* 2001;94(3):370-6.
42. Toyoda M, Takagi H, Horiguchi N, Kakizaki S, Sato K, Takayama H, et al. A ligand for peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells. *Gut.* 2002 April 1, 2002;50(4):563-7.
43. Koga H, Sakisaka S, Harada M, Takagi T, Hanada S, Taniguchi E, et al. Involvement of p21WAF1/Cip1, p27Kip1, and p18INK4c in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology.* 2001;33(5):1087-97.
44. Rumi MA, Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Hamamoto S, Kazumori H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2001 Jun 15;84(12):1640-7. PubMed PMID: 11401318. Pubmed Central PMCID: 2363681. Epub 2001/06/13. eng.
45. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* 2004 Jul;5(7):419-29. PubMed PMID: 15231248. Epub 2004/07/03. eng.
46. Gupta RA, Sarraf P, Mueller E, Brockman JA, Prusakiewicz JJ, Eng C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell type-specific mechanisms. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):22669-77. PubMed PMID: 12591919. Epub 2003/02/20. eng.
47. Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H. Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Feb;130(2):73-9. PubMed PMID: 14634802. Epub 2003/11/25. eng.
48. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, et al. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell.* 1999 Jun;3(6):799-804. PubMed PMID: 10394368. Epub 1999/07/08. eng.

49. Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 1998 Nov;115(5):1049-55. PubMed PMID: 9797355. Epub 1998/10/31. eng.
50. Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, et al. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *International journal of oncology*. 2004 Sep;25(3):631-9. PubMed PMID: 15289864. Epub 2004/08/04. eng.
51. Tanaka T, Kohno H, Yoshitani S, Takashima S, Okumura A, Murakami A, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2424-8. PubMed PMID: 11289109. Epub 2001/04/06. eng.
52. Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology*. 2003 Feb;124(2):361-7. PubMed PMID: 12557142. Epub 2003/01/31. eng.
53. Su W, Bush CR, Necela BM, Calcagno SR, Murray NR, Fields AP, et al. Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon. *Physiol Genomics*. 2007 Aug 20;30(3):342-53. PubMed PMID: 17519361. Epub 2007/05/24. eng.
54. Kohno H, Yoshitani S, Takashima S, Okumura A, Hosokawa M, Yamaguchi N, et al. Troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, inhibits chemically-induced aberrant crypt foci in rats. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 2001 Apr;92(4):396-403. PubMed PMID: 11346461. Epub 2001/05/11. eng.
55. Bahr IN, Tretter P, Kruger J, Stark RG, Schimkus J, Unger T, et al. High-dose treatment with telmisartan induces monocytic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes in patients with the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2011 Oct;58(4):725-32. PubMed PMID: 21876071.
56. Kakuta H, Kurosaki E, Niimi T, Gato K, Kawasaki Y, Suwa A, et al. Distinct properties of telmisartan on agonistic activities for peroxisome proliferator-activated receptor gamma among clinically used angiotensin II receptor blockers: drug-target interaction analyses. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Apr;349(1):10-20. PubMed PMID: 24424487.
57. Hilgers KF. Das Renin-Angiotensin-System. *Der Urologe A*. 2009;48(8):925-35.
58. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*. 2008 Sep;264(3):224-36. PubMed PMID: 18793332. Epub 2008/09/17. eng.
59. Lee LD, Mafura B, Lauscher JC, Seeliger H, Kreis ME, Grone J. Antiproliferative and apoptotic effects of telmisartan in human colon cancer cells. *Oncology letters*. 2014 Dec;8(6):2681-6. PubMed PMID: 25360175. Pubmed Central PMCID: 4214397.

60. Yaacob NS, Darus HM, Norazmi MN. Modulation of cell growth and PPARgamma expression in human colorectal cancer cell lines by ciglitazone. *Exp Toxicol Pathol*. 2008 Sep;60(6):505-12. PubMed PMID: 18579355. Epub 2008/06/27. eng.
61. Shen D, Deng C, Zhang M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgrad Med J*. 2007 Jun;83(980):414-9. PubMed PMID: 17551074. Epub 2007/06/07. eng.
62. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research*. 1976 Dec;36(12):4562-9. PubMed PMID: 1000501. Epub 1976/12/11. eng.
63. Rivenbark AG, Coleman WB. Epigenetic regulation of cystatins in cancer. *Frontiers in bioscience*. 2009;14:453-62. PubMed PMID: 19273077.
64. Bitzer EM, Grobe TG, Neusser S, Lorenz C. BARMER GEK Report Krankenhaus 2013, Schwerpunktsthema: Die stationäre Versorgung von Darmkrebs. 2013:253.
65. Clay CE, Monjazebe A, Thorburn J, Chilton FH, High KP. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPARgamma in breast cancer cells. *J Lipid Res*. 2002 Nov;43(11):1818-28. PubMed PMID: 12401880.
66. Abe A, Kiriya Y, Hirano M, Miura T, Kamiya H, Harashima H, et al. Troglitazone suppresses cell growth of KU812 cells independently of PPARgamma. *Eur J Pharmacol*. 2002 Feb 1;436(1-2):7-13. PubMed PMID: 11834241.
67. Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*. 2002 May 1, 2002;50(5):658-64.

## **7 Publikation**

Lee LD, Mafura B, Lauscher JC, Seeliger H, Kreis ME, Grone J.

Antiproliferative and apoptotic effects of telmisartan in human colon cancer cells. *Oncology letters*. 2014 Dec;8(6):2681-6. PubMed PMID: 25360175. Pubmed Central PMCID: 4214397.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Benjamin Mafura, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Antiproliferative und apoptotische Effekte von Telmisarten in humanen Kolonkarzinomzellen durch Aktivierung des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$**  selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### **Anteilserklärung an etwaige erfolgte Publikation**

Benjamin Mafura hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Lee LD, Mafura B, Lauscher JC, Seeliger H, Kreis ME, Grone J.**

**Antiproliferative and apoptotic effects of telmisartan in human colon cancer cells. Oncology letters. 2014 Dec;8(6):2681-6. PubMed PMID: 25360175. Pubmed Central PMCID: 4214397.**

Durchführung der Experimente und Datenerhebung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## 10 Danksagung

Ich bin allen zu tiefstem Dank verpflichtet, die zum Gelingen dieser Dissertation in verschiedenster Weise beigetragen haben. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei:

Herrn PD Dr. Jörn Gröne, Oberarzt und Bereichsleiter der kolorektalen Chirurgie der Klinik für Allgemein und Viszeralchirurgie an der Charité Berlin, für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit durchzuführen, die Betreuung während der Arbeit und für die optimistische und freundliche Unterstützung,

Herrn Dr. Lucas D. G. Lee für die freundliche Unterstützung und Betreuung und

Frau Sonja Sitali und Herrn Marco Arndt für die technische Unterstützung im Labor.

Meiner Ehefrau, meiner ganzen Familie und meinen Freunden möchte ich ebenfalls ein großes Dankeschön aussprechen.