

Aus dem
Pathologischen Institut
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchung des Zusammenhanges von Diabetes mellitus Typ II
und Kolorektalen Karzinomen (KRK) mit besonderem Fokus auf
Analysen zur Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR γ**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Leah Schöckel

aus
München

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Dr. Jens Neumann

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Tobias Schiergens

Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Johann Spatz

Promovierte Mitbetreuerin: Priv. Doz. Dr. Marlies Michl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	6
Abstract (English).....	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung	16
1.1 Kolorektales Karzinom.....	16
1.1.1 Epidemiologie, Diagnostik, Therapie.....	16
1.1.2 Molekulare Tumorgenese.....	18
1.2 Diabetes mellitus	19
1.3 Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Kolorektalem Karzinom	20
1.3.1 Gemeinsame Risikofaktoren und Epidemiologie	20
1.3.2 Hyperglykämie und Hyperinsulinämie.....	21
1.3.3 Korrelationen zwischen Pharmaka der Diabetestherapie und dem Tumorrisiko	24
1.4 PPAR γ	24
1.4.1 PPAR γ Struktur und Funktion.....	24
1.4.2 Glitazone (PPAR γ -Agonisten)	26
1.4.3 PPAR γ und Tumorgenese.....	26
1.4.4 PPAR γ und der Wnt-Signalweg	30
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	33
2 Studienkollektiv, Material und Methoden.....	34
2.1 Studienkollektiv.....	34
2.2 Erfasste Parameter.....	34
2.2.1 Diabetesdiagnose und Diabetestherapie	34
2.2.2 HbA1c	35
2.2.3 Überlebensdaten	35
2.3 Methoden.....	36
2.3.1 Immunhistochemie	36
2.3.1.1 Immunhistochemische Färbung von PPAR γ	36
2.3.1.2 Auswertung der Expression mittels H-Score.....	37
2.3.2 Zellkultur.....	39
2.3.2.1 Zelllinien	39
2.3.2.2 Standardkulturbedingungen, Passagieren und Einfrieren von Zelllinien	39
2.3.3 Molekularbiologische Methoden.....	41

2.3.3.1	RNA-Extraktion	41
2.3.3.2	Vermessung der Nukleinsäurekonzentration.....	41
2.3.3.3	cDNA-Synthese.....	42
2.3.3.4	Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR).....	42
2.3.4	Protein-basierte Methoden.....	43
2.3.4.1	Proteinextraktion	43
2.3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.3.4.3	Western Blot-Analyse	44
2.3.5	Zellbiologische Methoden	46
2.3.5.1	Transfektion.....	46
2.3.5.2	Read-Out PPAR γ Agonisten	47
2.3.5.3	Resazurin-Zellviabilitäts-Assay	47
2.3.5.4	ROS-Zielgene.....	50
2.3.6	Statistische Analysen.....	50
2.4	Material	51
2.5	Geräte	53
2.6	Software.....	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Studienpopulation.....	54
3.2	Histopathologie	56
3.2.1	H-Score: PPAR γ Expression	56
3.2.2	Korrelation der PPAR γ Expression mit Klinisch-Pathologischen Parametern	58
3.2.3	Korrelation der PPAR γ Expression und β -Catenin Expression und p53-Regulation....	60
3.2.4	PPAR γ Expression und Überleben.....	63
3.3	Zellkulturexperimente	67
3.3.1	Vortestungsergebnisse zur Etablierung der experimentellen Bedingungen	67
3.3.2	Proliferation-Zellviabilitäts-Assays.....	69
3.3.2.1	Knockdown von PPAR γ führt zur Reduktion der Zellviabilität in SW403.....	69
3.3.2.2	PPAR γ Inhibitor GW9662 senkt die Proliferationsrate in KRK-Zellen.....	70
3.3.2.3	PPAR γ Agonisten steigern die Proliferation in KRK-Zellen	71
3.3.3	Einfluss von Hypoxie auf die PPAR γ Funktion	73
3.3.4	Funktion von PPAR γ unter Elesclomol induzierter ROS-Produktion.....	75
3.3.4.1	PPAR γ schützt KRK-Zelllinien vor reaktiven Sauerstoffspezies.....	75
3.3.4.2	Expression wichtiger Gene des oxidativen Stresses.....	80
3.3.5	PPAR γ Agonisten erhöhen die 5-FU Chemotherapiesensitivität	81
4	Diskussion	84
4.1	PPAR γ Expression als Marker für klinisch-pathologische Parameter in Patienten mit KRK	84
4.2	Interaktion von PPAR γ mit β -Catenin.....	86

4.3	Interaktion von PPAR γ mit p53	87
4.4	Einfluss von PPAR γ auf die Proliferation von KRK-Zelllinien.....	88
4.5	Einfluss von PPAR γ auf die Proliferation von KRK-Zelllinien unter Hypoxie	90
4.6	Einfluss von PPAR γ auf reaktive Sauerstoffspezies	90
4.7	Einfluss von PPAR γ auf die Chemotherapiesensitivität.....	92
4.8	Limitationen	93
4.9	Ausblick.....	94
	Literaturverzeichnis.....	95
	Danksagung.....	103
	Affidavit	104
	Publikationsliste	105

Zusammenfassung

Das KRK sowie der Diabetes Mellitus stellen heute eines der bedeutsamsten Gesundheitsprobleme westlicher Industrienationen dar. In Deutschland beträgt die Diabetesprävalenz aktuell 7.2 %. Laut WHO-Organisation wird diese in den nächsten Jahren weiter ansteigen. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen für Patienten mit einer DM-Erkrankung eine Risikoerhöhung für die Entwicklung verschiedener Tumorentitäten. Auch für das KRK konnten bereits positive Assoziationen aufgezeigt werden.

Zukünftig werden in der Therapie von Karzinomen, neben den klassischen Chemotherapeutika mit teils ausgeprägten Nebenwirkungen, möglichst individualisierte Therapieschemata eine wichtige Rolle spielen. Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma (PPAR γ) gehört zu der Familie der Kernrezeptoren und ist an der Regulation der Adipogenese, des Lipidstoffwechsels, der Insulinsensitivität, der vaskulären Homöostase sowie der Inflammation beteiligt. In der Literatur sind zudem für verschiedene Tumorentitäten pro- und antitumorale Eigenschaften von PPAR γ beschrieben. Darüber hinaus sind PPAR γ -Agonisten, sogenannte Thiazolidindione, in der DM-Typ-II Therapie in Deutschland etabliert und verhältnismäßig nebenwirkungsarm. Vor diesem Hintergrund scheint die Charakterisierung von PPAR γ im KRK vielversprechend.

Für die Untersuchung der PPAR γ Funktion im KRK wurden 246 Gewebeproben aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) von Patienten mit KRK auf ihr PPAR γ Expressionsniveau analysiert. Das Studienkollektiv wurde anhand des Metastasierungsstatus (M0, PUL, HEP) in drei Kohorten mit jeweils 82 Fällen eingeteilt. Die Fälle in den drei Gruppen wurden zur Reduktion von Verzerrungen anhand der Tumorlokalisation, dem Tumorgrading und dem pT-Stadium paarweise zugeordnet. Weitere klinische und pathologische Daten wurden retrospektiv aus dem Tumorregister München akquiriert. Zudem führten wir Zellkulturexperimente an den kolorektalen Zelllinien SW403 und HT29 durch. Mittels Resazurin-Assay untersuchten wir die Zellviabilität in Abhängigkeit des PPAR γ Status (transienter Knockdown von PPAR γ , Inhibition von PPAR γ , Aktivierung von PPAR γ , Kontrolle) unter Normoxie und hypoxischen Bedingungen. Der Einfluss von PPAR γ auf reaktive Sauerstoffspezies wurde durch die zusätzliche Gabe von Elesclomol analysiert. Zudem wurde die Wirkung von PPAR γ auf die Chemotherapiesensitivität von 5-Fluorouracil mittels Resazurin-Assays untersucht.

In unserem Studienkollektiv zeigte sich verglichen mit der Gesamtbevölkerung in Deutschland mit 13.4 % eine erhöhte Prävalenz von DM-Typ-II bei Patienten mit KRK. Eine Korrelation der PPAR γ Expression mit dem T-Stadium ($p=0.324$), dem Nodalstatus ($p=0.441$) sowie dem Tumorgrading ($p=0.926$) konnten wir nicht zeigen. Allerdings stellte in unserem Studienkollektiv eine hohe PPAR γ Expression einen Risikofaktor für die pulmonale Metastasierung dar (**$p=0.019$**). Zudem korrelierte eine hohe PPAR γ Expression hoch signifikant mit einer hohen β -Catenin Expression (**$p=0.001$**) und einem deregulierten p53 (**$p=0.046$**). In der Kohorte der Patienten mit nicht metastasierten Kolonkarzinomen (M0) war die niedrige PPAR γ Expression signifikant (**$p=0.045$**) mit einem besseren Overall Survival vergesellschaftet. Bei pulmonal metastasierten Fällen (PUL) ließ sich eine Trendumkehr beobachten. Für Tumore mit hoher PPAR γ Expression zeigte sich eine Tendenz hin zu einem besseren Overall Survival ($p=0.059$). In der hepatischen Subkohorte (HEP) eignete sich PPAR γ nicht als Prädiktor für das Overall Survival ($p=0.512$).

In den Zellkulturexperimenten mit den Zelllinien SW403 und HT29 konnten wir durch die Gabe von Pioglitazon und Rosiglitazon dosisabhängig (20 μ M vs. 80 μ M) eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate beobachten. Der PPAR γ Inhibitor GW9662 (10 μ M) führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate. Der transiente Knockdown von PPAR γ führte hingegen nur in der Zelllinie SW403 zu einer Zellviabilitätsreduktion. Eine Veränderung der PPAR γ Funktion unter hypoxischen Bedingungen konnten wir nicht zeigen. Die Inhibition von PPAR γ in den Zelllinien SW403 und HT29 bzw. der Knockdown von PPAR γ in der Zelllinie SW403 führte zur signifikanten Abnahme der Zellviabilität unter der Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Gabe von Elesclomol. PPAR γ Agonisten waren nicht in der Lage den gezeigten schützenden Effekt von PPAR γ vor reaktiven Sauerstoffspezies zu steigern. Womöglich kann der protektive Effekt durch von uns gezeigte Veränderungen der CAT und UCP2 Expression erklärt werden. Außerdem konnten wir in den Zelllinien SW403 und HT29 eine signifikante Steigerung der Chemotherapiesensitivität für 5-Fluorouracil durch die Gabe von Pioglitazon bzw. Rosiglitazon 80 μ M beobachten.

Diese Arbeit zeigt, im Einklang mit der Literatur, eine erhöhte Diabetesprävalenz in Patienten mit einem KRK. Gemeinsame Risikofaktoren der beiden Krankheiten stellen mögliche Confounder in epidemiologischen Studien dar, sodass ein kausaler Zusammenhang kritisch hinterfragt werden muss.

Für PPAR γ wurden in der Vergangenheit bereits sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Eigenschaften beschrieben. In unserer Studienpopulation stellte eine hohe PPAR γ Expression einen Risikofaktor für die pulmonale Metastasierung dar. PPAR γ scheint abhängig von der Tumorbiologie und dem Tumorprogress unterschiedliche Funktionen einzunehmen. So ist eine niedrige PPAR γ Expression mit einem besseren Überleben in der M0-Kohorte und einem schlechteren Überleben in der PUL-Kohorte vergesellschaftet. Der Unterschied der Funktion von PPAR γ in nicht metastasierten Tumoren und KRK mit Lungenmetastasen sollte zukünftig weiter diskutiert werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse der Zellviabilitätsassays scheint die Aktivierung von PPAR γ zunächst zu einer gesteigerten Proliferation von kolorektalen Zelllinien zu führen und somit tumorprogressive Eigenschaften zu fördern. Durch die von uns beobachtete gesteigerte 5-FU-Chemotherapiesensitivität in kolorektalen Zellen unter der Gabe von PPAR γ -Agonisten könnte die Etablierung einer Kombinationstherapie beider Wirkstoffe möglicherweise trotzdem einen Vorteil für Patienten mit KRK darstellen. Randomisierte klinische Studien bleiben in Zukunft notwendig, um den in vitro beobachteten Effekt in vivo zu überprüfen.

Abstract (English)

CRC and diabetes mellitus represent one of the most significant health problems in western industrial nations. In Germany, the prevalence of diabetes is currently 7.2 %. According to the WHO organisation, this will continue to rise in the next years. Numerous epidemiological studies show an increased risk of developing different types of tumours in patients with DM. Positive associations have also been shown for CRC.

In the future, individualised therapy regimens will be developed in the therapy of CRC, in addition to the classical chemotherapeutic agents with several distinct side effects. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) belongs to the nuclear receptor family and is involved in the regulation of adipogenesis, lipid metabolism, insulin sensitivity, vascular homeostasis and inflammation. Furthermore, pro- and antitumour properties of PPAR γ have been described in the literature for various tumour entities. Moreover, PPAR γ agonists, so-called thiazolidinediones, are established in DM-type-II therapy in Germany and have relatively few side effects. In this context the characterisation of PPAR γ in CRC seems promising.

For the investigation of PPAR γ function in CRC, 246 tissue samples from the archives of the Institute of Pathology of the Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) of patients with CRC were analysed regarding their PPAR γ expression level. The study population was divided into three cohorts of 82 cases each based on metastatic status (M0, PUL, HEP). Cases in the three groups were matched in pairs based on tumour location, tumour grading and pT-stage to reduce bias. Further clinical and pathological data were retrospectively acquired from the Munich tumour registry. In addition, we conducted cell culture experiments with the colorectal cell lines SW403 and HT29. Using resazurin assay, we investigated cell viability depending on PPAR γ status (transient knockdown of PPAR γ , inhibition of PPAR γ , activation of PPAR γ ; control) under normoxia and hypoxic conditions. The effect of PPAR γ on reactive oxygen species was analysed by the additional administration of elesclomol. Moreover, the effect of PPAR γ on the chemotherapy sensitivity of 5-fluorouracil examined by means of resazurin assays.

Compared to the general population in Germany, our study population showed an increased prevalence of DM-type-II of 13.4 % in patients with CRC. We could not show a correlation of PPAR γ expression with T-stage ($p=0.324$), nodal status ($p=0.441$) and tumour grading ($p=0.926$). However, in our study population, high PPAR γ expression was a risk factor for pulmonary metastasis (**$p=0.019$**). In addition, high PPAR γ expression correlated significantly with high β -catenin expression (**$p=0.001$**) and deregulated p53 (**$p=0.046$**). In the cohort of patients with non-metastatic colon cancer (M0), low expression of PPAR γ was significantly (**$p=0.045$**) associated with better overall survival. In pulmonary metastatic cases (PUL), a trend reversal was observed. For cases with high PPAR γ expression, a trend towards better overall survival was detected ($p=0.059$). In the hepatic subcohort (HEP), PPAR γ failed to be a predictor of overall survival ($p=0.512$).

In the cell culture experiments with the cell lines SW403 and HT29, we observed a significant increase in proliferation rate by the administration of pioglitazone and rosiglitazone in a dose-dependent manner (20 μ M vs. 80 μ M). The PPAR γ inhibitor GW9662 (10 μ M) resulted in a significant decrease in proliferation rate in both cell lines. The transient knockdown of PPAR γ led to a cell viability reduction in the SW403 cell line. We could not show a change in PPAR γ function under hypoxic conditions. Inhibition of PPAR γ in the SW403 and HT29 cell lines and knockdown of PPAR γ in the SW403 cell line resulted in a significant decrease in cell viability

upon induction of reactive oxygen species by administration of elesclomol. PPAR γ agonists were not able to increase the protective effect of PPAR γ against reactive oxygen species. Possibly, the protective effect can be explained by changes in CAT and UCP2 expression. In addition, we observed a significant increase in chemotherapy sensitivity to 5-fluorouracil in the SW403 and HT29 cell lines by the administration of pioglitazone and rosiglitazone 80 μ M, respectively.

Consistent with the literature, we found an increased prevalence of diabetes in our population of patients with CRC. Common risk factors of both diseases are possible confounders in epidemiological studies, so a causal relationship must be critically questioned.

In the past tumour-promoting and tumour-inhibiting properties have been described for PPAR γ . In our study population, high PPAR γ expression was a risk factor for pulmonary metastasis. PPAR γ seems to have different roles depending on tumour biology and tumour progression. Thus, low PPAR γ expression is associated with better survival in the M0 cohort and poorer survival in the PUL cohort. The difference in the function of PPAR γ in non-metastatic tumours and CRC with lung metastases should be discussed further in the future.

In conclusion, the results of the cell viability assays indicate that activation of PPAR γ initially leads to increased proliferation of colorectal cell lines and thus promotes tumour-progressive properties. Due to the increased 5-FU chemotherapy sensitivity in colorectal cells under the administration of PPAR γ agonists, the establishment of a combination therapy of both agents could nevertheless represent an advantage for patients with CRC. Randomised clinical trials remain necessary to verify the effect observed in vitro in vivo.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz [11]	18
Abbildung 2: Pathogenese von KRK [4, 7].....	19
Abbildung 3: Hyperglykämie und Tumorgenese	23
Abbildung 4: PPAR γ Genregulation [48].....	25
Abbildung 5: PPAR γ Struktur [45]	25
Abbildung 6: PPAR γ -Funktion	26
Abbildung 7: PPAR γ und Tumorgenese	30
Abbildung 8: WNT-Signalweg [47].....	31
Abbildung 9: H-Score; A =keine Färbung, B =schwache Färbung, C =mäßige Färbung, D =starke Färbung, 200-fache Vergrößerung	38
Abbildung 10: PPAR γ Expression: A =low, B =high, 200-fache Vergrößerung.....	38
Abbildung 11: Verteilung der Diabetesmedikation im Studienkollektiv	56
Abbildung 12: H-Score getrennt nach Geschlecht.....	57
Abbildung 13: H-Score in den Subkohorten	57
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Schätzer der M0-Kohorte	64
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Schätzer der pulmonalen Kohorte	65
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Schätzer der hepatischen Kohorte	66
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Schätzer des Sheffer et al. Kollektivs[125]	67
Abbildung 18: PPAR γ -Expression in kolorektalen Zelllinien	67
Abbildung 19: Expressionsniveau von PPAR γ auf RNA-Ebene in Zelllinien des KRKs.....	68
Abbildung 20: Transienter KD von PPAR γ in den Zelllinien SW403 und HT29.....	68
Abbildung 21: CK20 Expression nach Behandlung mit PPAR γ -Agonisten	68
Abbildung 22: PPAR γ Knockdown reduziert die Proliferationsrate in SW403.....	69
Abbildung 23: Wachstumskurve der Zellen SW403 und HT29 mit PPAR γ Knockdown	70
Abbildung 24: Austestung der GW9662 Konzentration	70
Abbildung 25: PPAR γ Inhibitor GW9662 reduziert die Proliferation in kolorektalen Zelllinien.....	71
Abbildung 26: Austestung der Agonisten Konzentration.....	71
Abbildung 27: PPAR γ Agonisten fördern die Proliferation in kolorektalen Zelllinien	72
Abbildung 28: Wachstumskurve PPAR γ Agonisten.....	73
Abbildung 29: Knockdown von PPAR γ unter hypoxischen Bedingungen.....	73
Abbildung 30: Behandlung mit dem PPAR γ Inhibitor GW9662 unter hypoxischen Bedingungen	74
Abbildung 31: Behandlung mit PPAR γ Agonisten unter hypoxischen Bedingungen	75
Abbildung 32: PPAR γ schützt die Zelllinie SW403 vor ROS	76
Abbildung 33: Die Inhibition von PPAR γ erhöht die Sensitivität auf ROS.....	77
Abbildung 34: Wirkung von PPAR γ -Agonisten unter Elesclomol Behandlung in HT29	78
Abbildung 35: Wirkung von PPAR γ -Agonisten unter Elesclomol Behandlung in SW403.....	79
Abbildung 36: Expression wichtiger Gene des oxidativen Stresses.....	81
Abbildung 37: Dosis-Wirkungs-Kurve des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für das KRK [6]	17
Tabelle 2: UICC-Stadiengruppierung für das KRK [6].....	17
Tabelle 3: Diabetesmedikation	35
Tabelle 4: Zelllinien	39
Tabelle 5: Primersequenzen	40
Tabelle 6: Primersequenzen qPCR.....	43
Tabelle 7: Antikörper Western Blot	46
Tabelle 8: Transfektionslösung	47
Tabelle 9: Darstellung P-Werte	50
Tabelle 10: Material	52
Tabelle 11: Geräte	53
Tabelle 12: Software	53
Tabelle 13: Charakteristika der Studienpopulation	55
Tabelle 14: Deskriptive Statistik H-Score.....	56
Tabelle 15: H-Score in den Subkohorten	57
Tabelle 16: Korrelation PPAR γ Expression und Klinisch-Pathologischer Parameter	59
Tabelle 17: PPAR γ Expression in den Subkohorten	60
Tabelle 18: Hohe PPAR γ Expression korreliert mit pulmonaler Metastasierung	60
Tabelle 19: Keine Korrelation zwischen PPAR γ Expression und Lebermetastasen	60
Tabelle 20: Expression von PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin im Gesamtkollektiv.....	61
Tabelle 21: PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin (M0 und PUL).....	61
Tabelle 22: PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin (M0 und HEP).....	61
Tabelle 23: PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin (HEP und PUL).....	62
Tabelle 24: Korrelation der Genexpressionsdaten von PPAR γ und β -Catenin im TCGA-Kollektiv....	62
Tabelle 25: P53-Deregulation ist mit einer hohen Expression von PPAR γ assoziiert	62
Tabelle 26: Keine Korrelation zwischen der p53 Regulation und der PPAR γ Expression in den Subgruppen.....	63
Tabelle 27: P53-Deregulation ist mit einer hohen Expression von PPAR γ assoziiert (PUL und HEP) 63	63
Tabelle 28: Overall Survival der M0-Kohorte	63
Tabelle 29: Overall Survival der pulmonalen Kohorte	64
Tabelle 30: Overall Survival der hepatischen Kohorte	65
Tabelle 31: Signifikanzwerte der Wachstumskurven.....	73
Tabelle 32: P-Werte der Elesclomol-Assays.....	79
Tabelle 33: IC50 der Behandlungsgruppen.....	83

Abkürzungsverzeichnis

ACF	engl.: aberrant crypt foci, aberrante Kryptenherde
AGE	engl.: advanced glycation endproduct
AOM	Azoxymethan
APC	engl.: Adenomatous Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
BCL2	engl.: B-cell lymphoma 2
BSA	bovines Serum-Albumin
CAT	Catalase
CCLE	engl.: Cancer Cell Line Encyclopedia
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIMP	DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln
CIN	Chromosomale Instabilität
COX-2	Cyclooxygenase 2
DAB	Diaminobenzidin
DCC	engl.: Deleted in Colorectal Carcinoma
DKK1	engl.: Dickkopf related protein 1
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Dvl	engl.: Disheveled
ECL	engl.: enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale Mesenchymale Transition
FABP	engl.: fatty acid binding protein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	engl.: fetal bovine serum, fetales Kälberserum

FzD	Frizzled Rezeptor
GADD45	engl.: Gene Growth Arrest and DNA Damage
GLUT	Glucose Transporter
GPX1	Glutathione Peroxidase 1
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HbA1c	Hämoglobin A1c
HEP	Hepatische Kohorte
HIF-1 α	engl.: hypoxia-inducible Factor-1 α
hMLH1	engl.: mismatch repair genes human mutL homolog 1
HNPCC	engl.: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
IGF-1	engl.: insulin like growth factor 1
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ITF2	engl.: immunoglobulin transcription factor 2
K-Ras	engl.: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDL	Low-Density Lipoprotein
LEF	engl.: lymphoid enhancing factor
LMU	Ludwigs-Maximilians-Universität
LOH	engl.: loss of Heterozygosity, Heterozygotieverlust
LRP	Low Density Lipoprotein Corezeptor
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
miRNA	microRNA
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NF- κ B	engl.: nuclear factor kappa B
NOS	engl.: not otherwise specified; konventionelles Adenokarzinom im Kolon
OS	engl.: overall survival
PBS	engl.: phosphate buffered saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	engl.: Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPRE	Peroxisomen-Proliferator-Response-Elemente
PTEN	engl.: Phosphatase and tensin homolog
PUL	Pulmonale Kohorte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Rezeptoren
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAD4	engl.: MAD-Homolog 4
SOD1	Superoxide Dismutase 1
SOX2	engl.: sex determining region Y (SRY)- box 2
STAT3	engl.: signal transducer and activator of transcriptom 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	Tris-buffered saline / Tween 20
TCF	engl.: t-cell-factor
TCGA	engl.: The Cancer Genome Atlas
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	engl.: transforming growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNM	engl.: Tumour Node Metastasis
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZD	Thiazolidindione
UCP2	Uncoupling Protein 2
UICC	franz.: Union International Contre le Cancer
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor

v/v	Volumen pro Volumen
WHO	engl.: world health organisation, Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Akronym aus "wingless" und "INT-1"
w/v	Gewicht pro Volumen
5-FU	5-Fluorouracil

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie, Diagnostik, Therapie

Das Kolorektale Karzinom (KRK) trägt einen großen Teil zur Gesamttumormorbidität und -mortalität bei [1]. Mit über 64.000 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr wird die Diagnose bei einer von 20 Frauen und bei einem von 17 Männern gestellt [2, 3]. Das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter stetig an, über die Hälfte der Erkrankten sind älter als 70 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter für Frauen beträgt 76 Jahre, für Männer liegt es bei 72 Jahren. Seit 2003 ist nach Einführung von Früherkennungsuntersuchungen ein Absinken der altersstandardisierten Erkrankungsraten erkennbar. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei circa 62 %, wobei in den letzten zehn Jahren ein Rückgang der altersstandardisierten Sterberate von ungefähr 20 % zu verzeichnen war [3]. Insgesamt belaufen sich in Deutschland die Todesfälle auf über 25.000 Fälle pro Jahr. Das KRK stellt somit nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache dar [4]. Diese Zahlen zeigen auf, dass das KRK bis heute eines der bedeutsamsten Gesundheitsprobleme westlicher Industrienationen ist.

Neben dem in circa 75 % der Fälle auftretendem sporadischen KRK muss man zwischen erblichen Kolonkarzinom-Syndromen und KRK auf dem Boden eines erhöhten familiären Risikos differenzieren. Letztgenannte und vor allem das hereditäre KRK erhöhen das Erkrankungsrisiko deutlich [4]. Zu den Hauptrisikofaktoren des KRKs zählen vor allem der Tabakkonsum und das Übergewicht, gefolgt von Bewegungsmangel, ballaststoffarmer Diät, regelmäßigem Alkoholkonsum und dem Verzehr von rotem Fleisch. Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) steigern die Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich [1, 3].

KRK treten am häufigsten (55 %) im Rektosigmoid auf, gefolgt von rechtsseitigen Neoplasien mit etwa 13 %. In den letzten Jahren zeichnete sich im Kolon eine Umverteilung in der Auftretenshäufigkeit ab. Vor allem bei Frauen steigt die Inzidenz rechtsseitiger KRK, während die im Rektosigmoid abnimmt. Auch bei Männern ist diese Tendenz zu beobachten. Mit einem Anteil von über 90 % sind der Großteil der KRK Adenokarzinome. Es wird zwischen konventionellen Adenokarzinomen (NOS) und weiteren histopathologischen Varianten wie muzinösen, siegelringzelligen, medullären, serratierten, kribriform-komedoartigen, mikropapillären, adenosquamösen oder solid-undifferenzierten Subtypen differenziert [4, 5].

Die UICC (Union International Contre le Cancer) Stadieneinteilung erfolgt nach der Tumour Node Metastasis (TNM) Klassifikation. Sie ist der entscheidende Prädiktor für die Prognose von Patienten mit KRK. Sie basiert auf der Infiltrationstiefe des Tumors in die Dickdarmwand (T) sowie dem Vorliegen von Metastasen in Lymphknoten (N) bzw. von Fernmetastasen (M) [4, 6]. In Tabelle 1 ist die TNM-Klassifikation und in Tabelle 2 das darauf basierende UICC-Stadium dargestellt. Die Metastasierung des KRKs erfolgt meist lymphogen und das Risiko steigt mit dem Tumorstadium stetig an. Fernmetastasen des KRKs finden sich am häufigsten in der Leber und am zweithäufigsten in der Lunge [4].

T-Stadium	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in Situ: Infiltration der Lamina propria ohne Ausbreitung durch Muscularis mucosae
T1	Infiltration in Submucosa
T2	Infiltration in Muscularis propria
T3	Infiltration durch Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Perforation in das viszerale Peritoneum (T4a) und/oder direkte Infiltration in andere Organe /Strukturen (T4b)
N-Status	
NX	Regionäre Lymphknoten (LK) nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in 1-3 regionären LK (N1a Metastase in 1 regionärem LK, N2b Metastase in 2-3 regionären LK, N1c Tumorknötchen/Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen)
N2	Metastasen in ≥ 4 regionären LK (N2a 4-6 regionäre Lymphknoten, N2b ≥ 7)
M-Status	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden (M1a Metastasen auf ein Organ beschränkt und ohne Peritonealmetastasen, M1b Metastasen in mehr als einem Organ, M1c Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen)

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für das KRK [6]

Stadium	T-Stadium	N-Status	M-Status
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
II	T3, T4	N0	M0
III	Jedes T	N1, N2	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: UICC-Stadiengruppierung für das KRK [6]

Zu den klassischen Behandlungsansätzen in kurativer Intention zählen die operative Therapie, sowie adjuvante Chemo- und Radiochemotherapie. Im Rahmen der Therapie des Rektumkarzinoms spielen zudem neoadjuvante Therapien wie Kurzzeit-Radiotherapie oder Radiochemotherapie eine Rolle. Die genannten Therapieformen erfolgen abhängig vom Tumorstadium und dem Allgemeinzustand des Patienten sowie spezifischen Kontraindikationen der jeweiligen Therapie. Bei einer palliativen Situation ist neben der Tumorthherapie besonders auf bedarfsgerechte psychosoziale und psychoonkologische Versorgung zu achten [2].

1.1.2 Molekulare Tumorgenese

Die Molekulargenetik des sporadischen KRKs hat zunehmend an prognostischer Bedeutung gewonnen. Zur Aufklärung der molekularen Genese des sporadischen KRKs trugen die Erforschung der hereditären Kolonkarzinom Syndrome, wie die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC) bei. Der Großteil der KRK entsteht aus adenomatösen Vorgängerläsionen. Eine bedeutende Rolle spielen im Wesentlichen drei grundlegende Entstehungsmechanismen. In circa 60 % der sporadischen KRK findet man eine chromosomale Instabilität (CIN). Dieser Weg wird traditionell auch als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bezeichnet (siehe Abbildung 1). CIN-Tumore beruhen meist auf einer Inaktivierung des Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gens [4, 7, 8]. APC ist ein integraler Bestandteil des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [9]. Dieser Signalweg ist evolutionär hochkonserviert und spielt eine entscheidende Rolle im Signalaustausch von multizellulären Organismen [10]. Der Verlust beider APC-Allele führt zur Stabilisierung von β -Catenin, einem Proto-Onkogen, und dessen Translokation in den Nukleus. β -Catenin bindet an Transkriptionsfaktoren der Familie des T-cell-factor (TCF) und des lymphoid enhancing factor (LEF) und beeinflusst die Regulation von Genen, die eine wichtige Rolle in der Proliferation von Zellen spielen [9]. Weitere Entwicklungsschritte sind oftmals eine Mutation im Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (K-Ras) Onkogen, der Heterozygotieverlust (LOH) von Chromosom 18q21 und die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 [1, 4, 11].

Der zweite grundlegende Mechanismus ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI), die in ungefähr 10-15 % der sporadischen KRK gefunden wird. Ursächlich ist ein Defekt der DNA-Reparaturgene, meist eine Hypermethylierung des Promoters des mismatch repair genes human mutL homolog 1 (hMLH1). Infolgedessen kommt es zur Beeinträchtigung der Mismatch-Reparatur, gefolgt von einer Anhäufung von Mutationen in multiplen Genen. Als weiterer Mechanismus ist die DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln (CIMP) zu nennen. Diese ist oftmals eng verbunden mit einer B-Raf Mutation und MSI [4]. Die drei oben beschriebenen Entstehungsmechanismen sind in Abbildung 2 veranschaulicht.

Bei den Vorgängerläsionen, aus denen die Karzinome entstehen, differenziert man zwischen tubulären, villösen und serratierten Adenomen sowie Mischformen, denen unterschiedliche molekulare Entwicklungsschritte zugrunde liegen. Der traditionelle Weg der CIN mit Mutationen im APC und dem p53 Gen nimmt Entwicklung über tubuläre Adenome. Die Karzinogenese über serratierte Adenome basiert auf CIMP, B-Raf Mutationen und MSI. Der Entstehung von Karzinomen aus villösen Adenomen liegen meist CIMP, K-Ras und APC-Mutationen zugrunde [12].

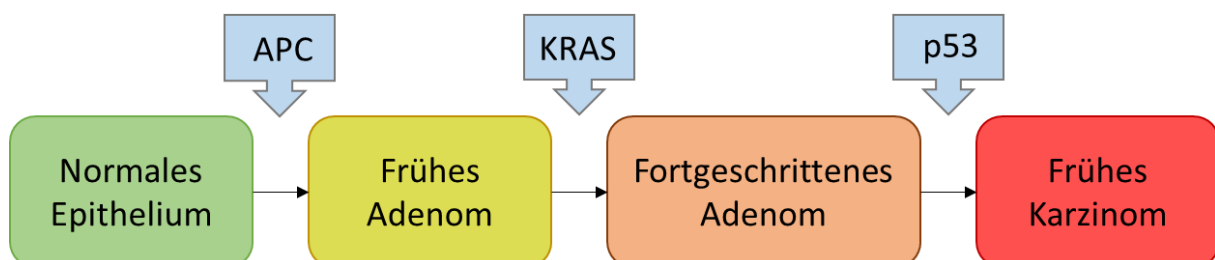


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz [11]

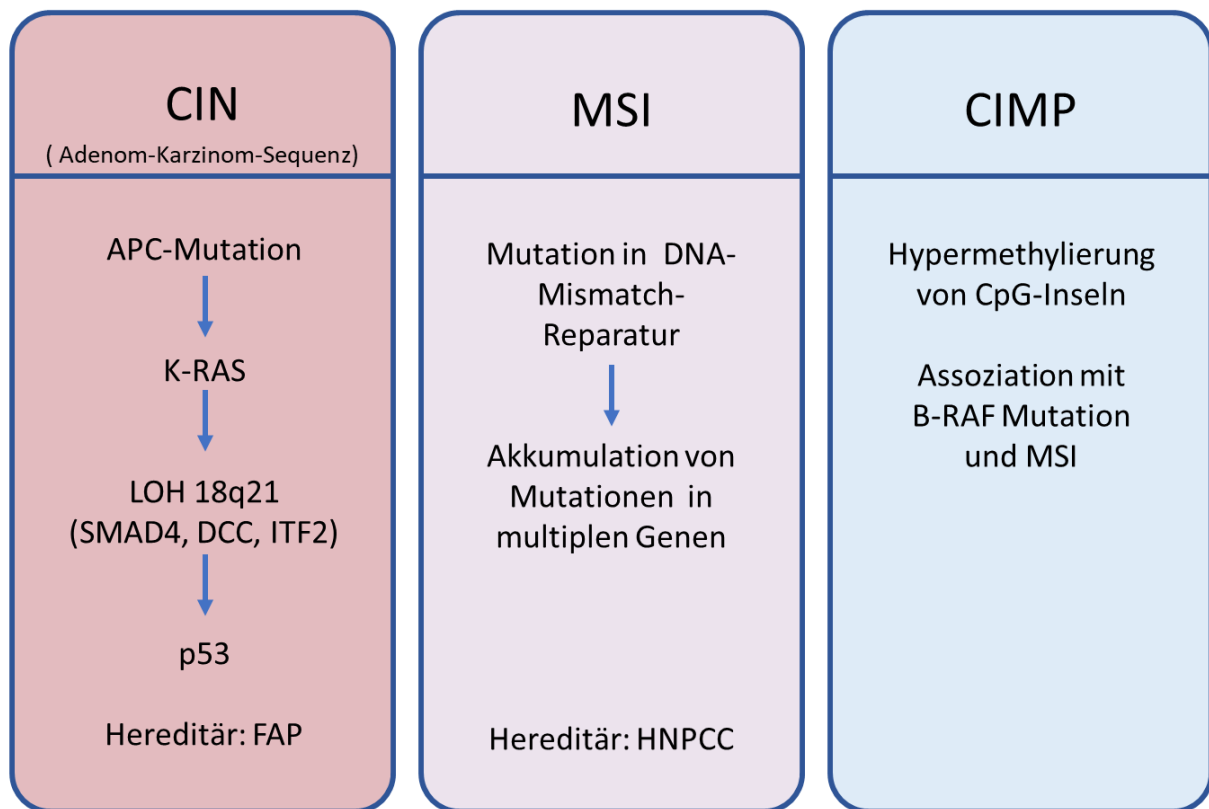


Abbildung 2: Pathogenese von KRK [4, 7]

1.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist eine häufig auftretende Stoffwechselkrankheit. Nach Angaben des Robert Koch-Instituts beträgt die Diabetesprävalenz in Deutschland 7.2 % für Personen zwischen 18 und 79 Jahren, dies entspricht in etwa 4.6 Millionen Einwohnern [13]. In den nächsten Jahren wird sich die Anzahl der Betroffenen weiter erhöhen. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Zahl der Menschen mit DM weltweit von 382 Millionen im Jahr 2015 auf 592 Millionen im Jahr 2030 steigen [14].

Die Klassifikation von DM erfolgt nach der Ätiologie. Der Typ-I-DM manifestiert sich meist im Kindes- und Jugendalter und hat eine geringere erbliche Komponente als der Typ-II-DM. Es kommt zur immunologisch vermittelten Destruktion der β -Zellen in den Langerhansinseln des Pankreas, woraus ein absoluter Insulinmangel resultiert [15, 16]. Die Therapie erfolgt durch manuelle oder pumpengesteuerte Insulinsubstitution ins subkutane Gewebe [17]. Mit über 90 % ist der Typ-II-DM die häufigste Form. Er beruht auf einer peripheren Insulinresistenz begleitet von einem relativen Insulinmangel oder auch einer gestörten Insulinsekretion. Diese Veränderungen werden hauptsächlich durch Überernährung mit Adipositas hervorgerufen. Weitere Risikofaktoren sind unter anderem familiäre Vorbelastung, höheres Lebensalter, sozialer Status, Bewegungsmangel, Rauchen sowie die Vorerkrankung mit dem metabolischen Syndrom. Die klinische Manifestation erfolgt meist schleichend über Jahre und im mittleren bis höheren Lebensalter. Die Diagnose kann entweder über den Hämoglobin A1c-Wert (HbA1c) (≥ 6.5 %) oder den venösen Plasmaglucosespiegel (Nüchtern-glucosewert ≥ 126 mg/dl und/oder

2h-oraler Glucose-Toleranz-Test-Plasmaglucosewert ≥ 200 mg/dl) gestellt werden. Die Therapie basiert auf einem Stufenkonzept. Wenn die zuvor festgelegten individuellen Therapieziele nicht erreicht werden konnten, wird mit der jeweils nächst höheren Stufe begonnen. Die Basistherapie (Stufe 1) beruht auf lebensstilmodifizierenden, nichtmedikamentösen Maßnahmen. Bei Stufe zwei kommt eine Pharmaka-Monotherapie mit Metformin (erste Wahl) hinzu. Ab Stufe drei werden Medikamentenzweifachkombination eingesetzt oder eine Insulintherapie begonnen. Die vierte und letzte Stufe beruht auf einer intensivierten Insulin- und Kombinationstherapie [15, 16]. Sowohl Typ-I-DM als auch Typ-II-DM können chronische Komplikationen wie die Makroangiopathie, die Mikroangiopathie, die Polyneuropathie und das diabetische Fußsyndrom auslösen [15]. Des Weiteren werden Zusammenhänge zwischen DM und dem KRK diskutiert, auf welche unter Punkt 1.3 eingegangen wird [18].

1.3 Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Kolorektalem Karzinom

1.3.1 Gemeinsame Risikofaktoren und Epidemiologie

Patienten mit DM unterliegen einem größeren Risiko zur Entwicklung eines Tumors wie dem Mammakarzinom, Leberzellkarzinom, Blasenzellkarzinom, Pankreaskarzinom, Endometriumkarzinom und dem KRK. Diskutiert werden die Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), oxidativer Stress, abnormale Sexualhormone, und gesteigerte Inflammation als mögliche zugrundeliegende Prozesse für das gesteigerte Karzinomrisiko [14].

Zahlreiche epidemiologische Studien deuten an, dass DM und vor allem DM-Typ-II mit einem erhöhten Tumorrisiko vergesellschaftet ist. Eine US-Studie, die eine größere Kohorte untersuchte, konnte eine erhöhte adjustierte Hazard-Ratio für das KRK für Frauen und Männer zeigen. Ähnliche Assoziationen konnten auch in Japan, China, Australien und in einigen europäischen Ländern nachgewiesen werden [18, 19]. Andere Studien zeigten allerdings, wie zum Beispiel eine weitere Analyse aus den USA aus dem Jahr 2018, die auf 1923 Krankenakten basiert, keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem KRK und DM [20]. Zur Beurteilung der unterschiedlichen Ergebnisse sind demnach weiterführende Untersuchungen notwendig. Neben den widersprüchlichen Ergebnissen vergangener Studien kommt dazu, dass DM und das KRK sich überschneidende Risikofaktoren haben. Unter anderem gehören dazu die Adipositas, eine proteinreiche und ballaststoffarme Diät, die Inflammation, das Mikrobiom sowie das Alter. Die einzelnen Faktoren sind ausführlicher unter den Punkten 1.1.1 für das KRK und 1.2 für den DM zu finden. Diese negativen Einflussfaktoren sind mögliche Confounder in epidemiologischen Studien [18].

Darüber hinaus könnte das Mikrobiom des Darms eine Rolle für den Zusammenhang von KRK und DM spielen. Das Mikrobiom des Körpers stellt ein komplexes Ökosystem mit enormer mikrobieller Diversität dar. Intestinale Dysbiose ist assoziiert mit einer unerwünschten Dysbalance zwischen schädlichen und günstigen Darmbakterien. Es ist bekannt, dass eine Störung dieser Homöostase weitreichende Effekte auf die lokale und systemische Immunität haben kann. Einige Autoren weisen als weitere mögliche Verbindung zwischen dem KRK und DM auf die Dysbiose hin [21].

Zur Verknüpfung der beiden Krankheiten trägt möglicherweise eine weitere gemeinsame Eigenschaft, die Überaktivierung des WNT-Signalwegs sowohl im DM-Typ-II als auch im KRK, bei. Auch kann Glucose selbst zur Aktivierung des Signalwegs führen. Auf die Pathologie der gesteigerten Aktivierung des WNT-Signalwegs wird unter Punkt 1.4.4 genauer eingegangen [22].

1.3.2 Hyperglykämie und Hyperinsulinämie

Wie bereits unter Punkt 1.3.1 erwähnt sind die Hyperglykämie und die Hyperinsulinämie möglicherweise ursächliche Umweltfaktoren, die die Korrelation zwischen dem KRK und der Erkrankung mit DM erklären könnten [14].

Im Einklang dazu stellt Glucose den treibenden Faktor für das Tumorzellwachstum dar. So nehmen Tumorzellen vermehrt Glucose, unter anderem aufgrund einer gesteigerten Expression von Glucose Transporter 1 (GLUT1) und GLUT3, auf [23]. Hyperglykämie und der Warburg-Effekt (anaerobe Glykolyse bei ausreichender Sauerstoffzufuhr) steigern den Glucosemetabolismus in Tumorzellen. Die vermehrte anaerobe Glykolyse in Tumorzellen führt darüber hinaus zu einem Laktatanstieg und bewirkt über die Ansäuerung des Tumorumfelds die Induktion von Zelltod von nichtmalignem Gewebe. Die Tumorzellen gewinnen darüber „Platz“ zur Migration [23-25]. Auch Prozesse wie die Proliferation und die Apoptose werden über ein Absinken des extrazellulären pH-Werts in Umgebung der Tumorzellen, dem sogenannten „reversed pH gradient“ Effekt, gesteigert [26].

Außerdem konnten Zellkulturexperimente mit den KRK-Zelllinien HT29, SW480 und SW620 zeigen, dass unter hyperglykämischen Konditionen die Proliferationsrate signifikant ansteigt [24, 27]. Auch die Migrationsaktivität und die Migrationsdistanz steigerten sich in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. DNA-Microarray Analysen zeigten unter hyperglykämischen Bedingungen eine signifikante (> 2.5fach) Erhöhung der Aktivität von Genen, die eine Rolle spielen in der Proliferation, Adhäsion und Migration. Dazu gehören zum Beispiel Cyclin A1, Cylin E2, Transkriptionsfaktor E2F und die Proteinkinase Ca [24]. Außerdem konnte in einem Scratch Assay an HCT-116 und HT29 KRK-Zelllinien veranschaulicht werden, dass die Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen schneller aufeinander zuwachsen. Hyperglykämie kann demzufolge die Invasion und Migration von Zellen des KRK fördern. In den selben Zelllinien war Ki-67, einer der wichtigsten Proliferationsmarker in Tumorzellen, unter Kulturbedingungen mit hohen Glucosespiegeln im Vergleich zur Kontrollgruppe (physiologische Glucosespiegel) stärker exprimiert [28].

Hyperglykämische Bedingungen konnten zudem die Apoptoseinduktion in RKO und HCT-116 Zellen hemmen. Hohe Glucosespiegel führen zu einer Abnahme der Phosphorylierung von p53 an Serin 46 und reduzieren darüber die proapoptotischen Eigenschaften von p53 [29].

Überdies zeigten in vitro Experimenten an KRK-Zelllinien HCT-116 und HT29, dass Hyperglykämie die Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT) begünstigt [28]. EMT ist der morphologische Übergang einer Epithelzelle zu einer Zelle mit mesenchymalen Eigenschaften. In der Regel tritt der Prozess während der Embryogenese und der Wundheilung auf [30]. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und Claudin 1 sinkt, während Marker für den mesenchymalen Typ wie Vimentin, N-Cadherin, β -Catenin und Snail stärker exprimiert werden [27, 28]. Niedrige Expressionslevel von E-Cadherin sind mit einer gesteigerten

Invasion ins umliegende Gewebe assoziiert [24]. Bei einer viertägigen Exposition mit hohen Glucosespiegeln (30 mmol/l) kam es zu einer verringerten Expression von E-Cadherin und einer gesteigerten Expression von Vimentin in HCT-116 und HT29 Zellen [28]. Diese signifikanten Änderungen der Expressionsmuster hin zum mesenchymalen Typ unter hohen Glucosespiegeln konnten auch in SW480 und SW620 Zellen gezeigt werden [27].

MicroRNAs (miRNA) sind nicht-codierende RNAs, die das Epigenom posttranskriptionell regulieren. Zahlreiche Zielgene von miRNA sind an Prozessen, wie der Apoptose, der Proliferation, der Differenzierung und der zellulären Seneszenz beteiligt [31]. Die Teilhabe von miRNA an der Tumorphagenese ist heute etabliert. Die miRNA-9 hat eine tumorsuppressive Wirkung und verhindert die EMT, möglicherweise über eine Inhibierung des IGF1R-Signalwegs. Hohe Glucosespiegel in SW480 und SW620 konnten die Expression von miRNA-9 signifikant senken. Hyperglykämie kann somit die tumorsuppressive Rolle von miRNA-9 senken und die EMT fördern [27].

Auch die Angiogenese, welche einen wichtigen Prozess für die Tumorentwicklung darstellt, wird durch hohe Glucosespiegel beeinflusst. Hyperglykämie kann in Tumoren möglicherweise über den hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor (HIF-1/VEGF) - Signalweg die Angiogenese fördern. Glukagon induzierte Hyperglykämie konnte unter hypoxischen Bedingungen die HIF-1 vermittelte VEGF-Expression steigern. Außerdem konnte immunhistochemisch eine erhöhte Mikrogefäß-Dichte in Tumor-Xenografts nachgewiesen werden [32].

In anderen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Hyperglykämie und Advanced Glycation End Products (AGE) oxidativen Stress und Inflammation fördern. Diese Prozesse können zu Schäden an zellulären Komponenten führen und einen Beitrag zur malignen Transformation leisten [18]. Langzeithyperglykämie führt zur Produktion von proinflammatorischen Faktoren wie Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) und Cyclooxygenase-2 (COX-2). Diese Faktoren stimulieren die Expression von Onkogenen, welche den Zellzyklus regulieren, die Proliferation fördern, die Apoptose inhibieren und die EMT induzieren [14]. Darüber hinaus konnte eine systematische Analyse aus dem Jahr 2015 für einen Großteil der eingeschlossenen Studien eine positive Assoziation bezüglich des HbA1c Wertes und dem Risiko für das Auftreten von KHK zeigen. HbA1c ist ein Biomarker, der Aussagen über den Blutglucosespiegel zulässt. Die genauen Eigenschaften des Parameters sind unter Punkt 2.2.2 erläutert [33].

Für hohe Blutglucosespiegel konnte zudem eine erhöhte Resistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika nachgewiesen werden. Patienten mit KHK, begleitet von einer Hyperglykämie, bedürfen einer höheren 5-Fluorouracil (5-FU) Dosis und einer längeren Therapie, um das Tumorzellwachstum zu inhibieren [14].

In Abbildung 3 sind die wichtigsten Prozesse, die von dem Zustand der Hyperglykämie beeinflusst sind, noch einmal veranschaulicht.

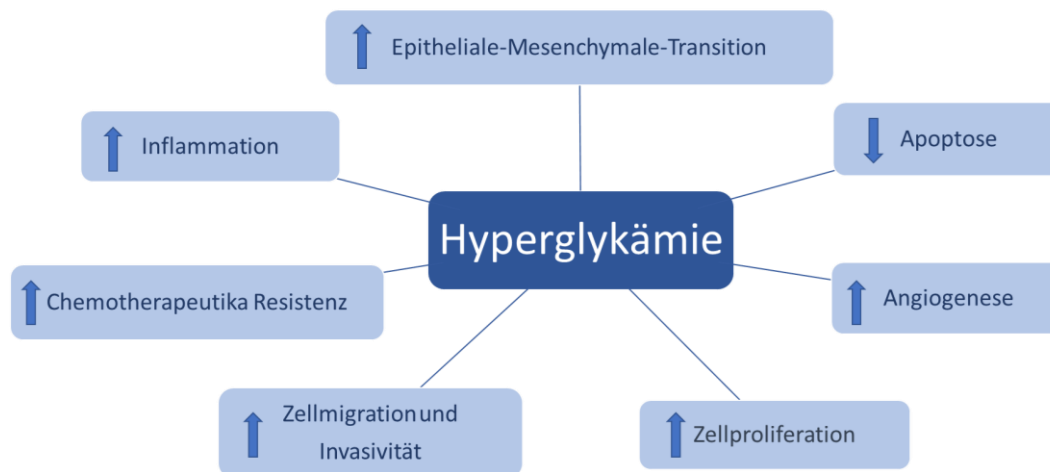


Abbildung 3: Hyperglykämie und Tumorgenese

Neben dem Zustand der Hyperglykämie wird auch die Hyperinsulinämie als eine mögliche Ursache für die Assoziation von KRK mit der Erkrankung DM diskutiert. Die Hypothese basiert auf der Annahme, dass Hyperinsulinämie das Tumorwachstum fördert. Höhere Konzentrationen von freiem Insulin sowie dem IGF-1 steigern die Zellproliferation und die Zelltransformation. Einige Tumorzellen überexprimieren Rezeptoren wie den Insulin Rezeptor A sowie den IGF-1 Rezeptor. Die gesteigerte Signalwirkung begünstigt die proliferativen Eigenschaften der beiden Hormone [22]. Ligandenbindung an IGF Rezeptoren löst bekanntermaßen mitogene Prozesse, wie die der Zellproliferation, der Angiogenese und der Metastasierung aus. Außerdem fördert ein hoher Insulinspiegel durch hepatische Aktivierung des Somatotropinrezeptors die Sekretion von IGF und verstärkt somit die mitogenen Effekte. Vermittelt werden die zellteilanregenden Prozesse über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Zusätzlich stimuliert Hyperinsulinämie die Produktion von Leptin über den Faktor HIF-1 α . Für das Mamma-, Prostata- und Oesophaguskarzinom konnte bereits eine Leptin-vermittelte Proliferationsstimulierung gezeigt werden [34].

Nicht nur in vitro Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und dem KRK. Eine britische Studie aus dem Jahr 2012 mit einer Studienpopulation von fast 5000 postmenopausalen Frauen zeigt eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Nüchternglucosespiegel und dem KRK. Für den Seruminsulinspiegel konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden [35]. Einige weitere Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen über den Zusammenhang zwischen dem Blutglucosespiegel bzw. dem Seruminsulinspiegel und dem Risiko für ein KRK wurden veröffentlicht. Vulcan et al.[36], Xu et al.[37] und Shin et al.[38] konnten einen positiven Zusammenhang für den Blutglucosespiegel belegen. Außerdem zeigten Gunter et al.[39] und Limburg et al.[40] einen signifikanten positiven Zusammenhang für den Seruminsulinspiegel, nicht aber für den Blutglucosespiegel. Stocks et al.[41] und Tsushima et al.[42] fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Blutglucosespiegel und dem Auftreten von KRK.

1.3.3 Korrelationen zwischen Pharmaka der Diabetestherapie und dem Tumorrisiko

Für zahlreiche Medikamente, die Einsatz in der Therapie des DM finden, konnten auch relevante Tumoreffekte gezeigt werden. Metformin, ein sehr häufig eingesetztes Medikament bei DM-Typ-II, inhibierte in Zellkulturexperimenten an SW480 Zellen die Proliferation zeit- und dosisabhängig. Auch ein Anti-EMT Effekt für Metformin konnte beobachtet werden. Nach transforming growth factor β (TGF- β) induzierter EMT konnte eine Behandlung mit Metformin in SW480 und HCT-116-Zellen Vimentin herunterregulieren und E-Cadherin hochregulieren [30]. Außerdem inhibiert Metformin inflammatorische Prozesse durch Reduzierung der Nuclear factor kappa B (NF- κ B) Aktivität [43]. Auch in klinischen Studien ist die Einnahme von Metformin mit einem besseren Outcome für Diabetiker mit Krebs assoziiert [44]. Der Effekt von Sulfonylharnstoffen auf die Tumorentwicklung in Diabetikern scheint unklar. Es konnten sowohl suppressive Wirkungen auf die Migration und Invasivität als auch ein signifikant erhöhtes Tumorrisiko für Diabetiker mit Sulfonylharnstofftherapie nachgewiesen werden. Für exogenes Insulin konnten einige Autoren eine Assoziation bezüglich eines gesteigerten Tumorrisiko zeigen. Vor allem langwirksame Insulinanaloga stehen unter dem Verdacht das Risiko zu erhöhen. Allerdings lassen sich dazu auch gegenteilige Berichte finden. Für GLP-1-Agonisten sowie DDP-4-Inhibitoren wurden zahlreiche widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht [34].

Das Kapitel 1.4.3 behandelt ausführlich die Einflüsse von den in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden PPAR γ -Agonisten, den Thiazolidindionen (TZD), auf die Tumorentstehung.

1.4 PPAR γ

1.4.1 PPAR γ Struktur und Funktion

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gehören zu der Familie der Kernrezeptoren. Drei PPAR Isotypen mit jeweils gewebespezifischem Expressionsmuster sind bis dato identifiziert: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ [45].

PPAR γ wird in Fettgewebe, Muskulatur, Gastrointestinaltrakt, Blutzellen, Makrophagen und Leberzellen exprimiert. PPAR γ bildet Heterodimere mit Retinoid X Rezeptoren (RXR) und erkennt spezifische Sequenzmotive, die sogenannten Peroxisomen-Proliferator-Response-Elemente (PPRE), in regulatorischen Regionen von Zielgenen. Ligandenbindung an PPAR γ induziert eine Konformitätsänderung und führt zur Ablösung von Co-Repressoren und zur Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren (siehe Abbildung 4). Liganden von PPAR γ sind unter anderem mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Prostaglandine, Leukotriene, Eicosanoide, Low-Density Lipoprotein (LDL) und TZD [45, 46]. Die strukturelle Heterogenität dieser Verbindungen scheint sich in der Ligandenbindungsdomäne (LBD), welche eine Y-förmige, hydrophobe Tasche mit niedriger Bindungsspezifität formt, von PPAR γ abzubilden [47].

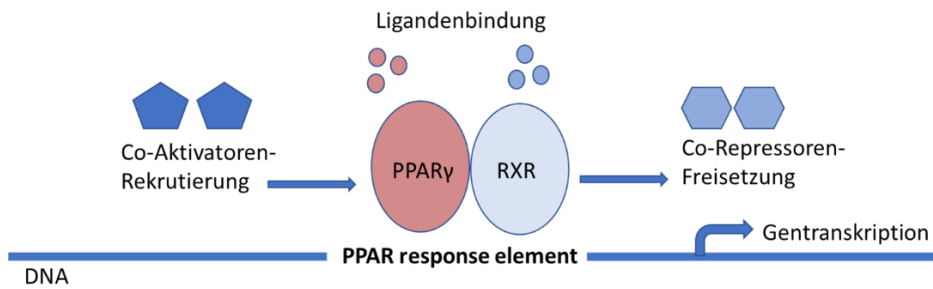


Abbildung 4: PPAR γ Genregulation [48]

Das reife Protein besitzt die gleiche Gesamtstruktur wie die von allen nukleären Rezeptoren. Die stark variable A/B Region am N-Terminus enthält die Liganden-unabhängige Transaktivierungsdomäne (AF1) sowie Lysin 79 und Serin 84 Reste, welche Angriffspunkte von Sumoylierung und Phosphorylierung sind und darüber hemmend auf die Rezeptoraktivität wirken. Die C-Region ist die DNA-Bindungsdomäne. Sie ist charakterisiert durch zwei C4 Zinkfingerproteine, die mit der Major Groove der DNA interagieren. Die D-Region, oder auch Hinge Region genannt, ermöglicht Rezeptor Dimerisierung und DNA-Bindung. Die E/F-Region ist die oben genannte LBD. Sie besteht aus 12 α Helices und aktiviert vor allem über die AF2 Domäne die Rekrutierung von Koaktivatoren und die Freisetzung von Korepressoren bei Ligandenbindung [45]. Die Struktur von PPAR γ ist in Abbildung 5 dargestellt.

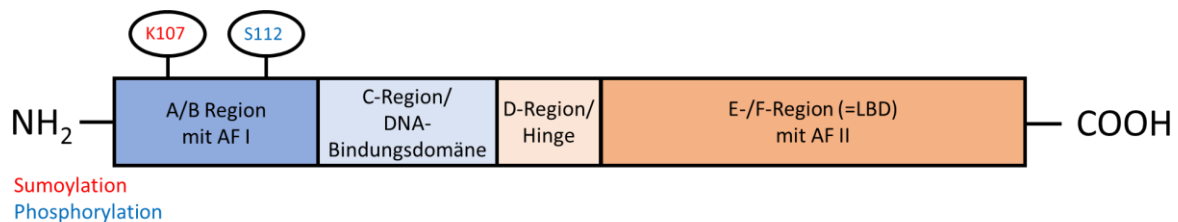


Abbildung 5: PPAR γ Struktur [45]

Durch alternatives Spleißen des PPAR γ -Gens entstehen unterschiedliche PPAR γ Isoformen. PPAR γ 2 besitzt am N-Terminus 30 zusätzliche Aminosäuren verglichen mit PPAR γ 1 und wird ausschließlich in Adipozyten exprimiert [48]. PPAR γ 1 hingegen wird in zahlreichen Geweben exprimiert und scheint die Hauptisoform von PPAR γ zu sein [49]. Zwei weitere mRNA Splice-Varianten, PPAR γ 3 und PPAR γ 4, welche das gleiche Protein wie PPAR γ 1 bilden, sind bekannt. Die biologische Relevanz dieser Varianten bleibt bisher unklar [48].

Die Aufgaben von PPAR γ (vergleiche Abbildung 6) sind vielfältig, die Wichtigsten werden nachfolgend beschrieben. Eine zentrale Rolle spielt PPAR γ in der Adipogenese, bei der Entwicklung von einem fibrozytären Präadipozyten zu einem lipidreichen Adipozyten. Neben der tragenden Rolle in der Entwicklung von Fettzellen ist PPAR γ wichtig für die Regulation der Lipidhomöostase. Fettsäuren werden über verschiedene PPAR γ -abhängige Signalwege aus dem Kreislauf und anderem Gewebe in Adipozyten aufgenommen. Außerdem beeinflusst es den Glucosespiegel und erhöht die Insulinsensitivität in Fett- und Muskelgewebe. So erhöhen zum Beispiel Glitazone, PPAR γ -Agonisten, die Expression von Adiponectin, einem Insulinsensitizer. Darüber hinaus spielt es eine Rolle in der Modulation von inflammatorischen und immunologischen Prozessen. Glitazone inhibieren die Expression von inflammatorischen Proteinen wie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), TNF- α , COX2 und Matrix-

Metalloprotease 9 (MMP-9) und hemmen den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher einen tragenden Anteil an der Entwicklung von Entzündungen hat. Zuletzt spielt PPAR γ eine Rolle in der Regulation der vaskulären Homöostase [46, 47, 50, 51].

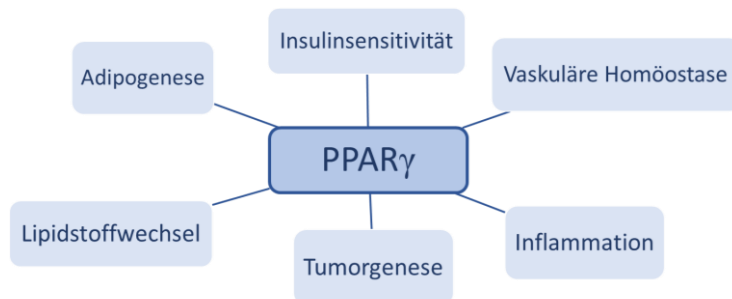


Abbildung 6: PPAR γ -Funktion

1.4.2 Glitazone (PPAR γ -Agonisten)

TZD bzw. Glitazone sind wie bereits erwähnt PPAR γ Agonisten und werden als orale Antidiabetika zur Therapie von DM-Typ-II eingesetzt. Aktuell ist in Deutschland aus der Wirkstoffgruppe nur noch Pioglitazon zugelassen, welches nur bei Patienten mit Unverträglichkeit von Vergleichsmedikamenten eingesetzt werden soll. Rosiglitazon wurde aufgrund eines ungünstigen Nutzen-Risiko Profils am 01.11.2010 vom Markt genommen [15]. Der Wirkmechanismus basiert auf einer Senkung der Insulinresistenz. TZD sind Liganden von PPAR γ -Rezeptoren und greifen darüber in die Regulation von Lipidstoffwechsel, Glucosestoffwechsel und die Insulinsignaltransduktion ein [17].

1.4.3 PPAR γ und Tumorgenese

Die unter Punkt 1.4.1 genannten PPAR γ abhängigen Prozesse, wie zum Beispiel die Inflammation, welche selbst mit der Tumorentwicklung assoziiert ist, steigern die Relevanz für die Erforschung des Zusammenhangs von PPAR γ und der Entstehung von Tumoren [50]. Auch der bereits stattfindende Einsatz als Therapeutikum in der Diabetestherapie steigert das Interesse an der Charakterisierung von PPAR γ in der Karzinogenese.

PPAR γ ist in 70 % der sporadischen KRK stark und in circa 30 % schwach exprimiert [52]. Es gibt zunehmende Evidenz dafür, dass die PPAR γ Aktivität vor allem während der Transition vom Adenom zum Karzinom abgeschwächt ist. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass der Einsatz von PPAR γ -Agonisten vor allem in frühen Stadien von KRK sinnvoll ist [47, 53]. In der Literatur finden sich auch Nachweise darüber, dass Mutationen im PPAR γ -Gen mit der Entwicklung von Neoplasien assoziiert sind [54, 55]. Auch ein Knock-Out von PPAR γ in APC^{min/+} Mäusen führte zu einer steigenden Anzahl von KRK [56].

Im Einklang dazu zeigten einige Studien an Azoxymethan (AOM)-behandelten Nagetieren, einem klassischen präklinischem Tumormodell für das KRK, dass TZD die Karzinogenese von

Kolontumoren inhibieren [53]. Osawa et al.[57] demonstrierte an AOM-behandelten Mäusen sowohl für Rosiglitazon, Pioglitazon als auch für Troglitazon eine supprimierende Wirkung auf die Anzahl von aberranten Kryptenherden (ACF). ACF ist eine frühe Stufe in der kolorektalen Karzinogenese und ein etablierter Biomarker für das Risiko zur Entstehung eines KRKs [58]. Vergleichbare Ergebnisse konnten Ueno et al.[59] an adipösen KRK-A^y-Mäusen zeigen. Die Pioglitazon-Behandlung senkte signifikant die Anzahl von ACF im proximalen und mittleren Kolonabschnitt. Auch Kohno et al.[60] legten in AOM-behandelten Ratten eine supprimierende dosisabhängige Wirkung von Troglitazon auf die Anzahl der ACFs dar. Ebenfalls konnte eine klinische Studie aus dem Jahr 2010 zeigen, dass die Gabe von Pioglitazon die Anzahl von ACF im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Therapie signifikant senken konnte [58]. Im Gegensatz dazu konnten Lefebvre et al.[61] zeigen, dass die Aktivierung von PPAR γ zur Steigerung der Auftretenshäufigkeit von KRK in C57BL/6J-APC^{Min}-Mäusen sowie zu einer Progredienz der Tumorgroße führt. Troglitazon führte außerdem in APC^{Min}-Mäusen zu einer verstärkten Entstehung von Dickdarmpolypen [62].

Eine Fall-Kontroll-Studie aus Taiwan zeigte für Menschen mit einer Diabeteserkrankung ein geringeres Risiko zur Entwicklung eines KRKs bei Patienten, die TZD eingenommen haben, verglichen mit Patienten, die nie TZD eingenommen haben. Diese Studie liefert klinische Evidenz, dass PPAR γ -Agonisten einen antineoplastischen Effekt auf das KRK in Patienten mit DM haben könnten [63]. Im Einklang dazu konnte eine große nationale Fall-Kontroll-Studie mit DM-Typ-II-Patienten ein signifikant geringeres Risiko zur Entwicklung eines KRKs unter der Einnahme von Rosiglitazon zeigen, nicht allerdings unter der Einnahme von Pioglitazon [64]. Govindarajan et al.[65] konnten für das Lungenkarzinom, aber nicht für das KRK und das Prostatakarzinom, zeigen, dass die Einnahme von TZD das Risiko für die Karzinomentwicklung senkt. Eine große Metaanalyse hingegen zeigte für die Einnahme von Rosiglitazon keine signifikante Modifikation des gastrointestinalen Krebsrisikos [66].

Zudem wird, vermittelt über PPAR γ Agonisten, sex determining region Y (SRY)- box 2 (SOX2) runterreguliert. Dieses Gen ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in Stammzellen [67]. Für das rechtsseitige KRK konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von SOX2 und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen sowie dem histopathologischen Tumorgrad gezeigt werden [68]. Zu den gleichen Ergebnissen kam auch eine Metaanalyse aus dem Jahr 2020, eingeschlossen wurden 14 Studien. Diese Beobachtung könnte die Grundlage für die in der Literatur beschriebene Assoziation zwischen einer starken SOX2 Expression und ein einer schlechteren Prognose für Patienten mit KRK sein [69].

In weiteren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass PPAR γ Liganden wie Rosiglitazon und Troglitazon Einfluss haben auf den Zell-Zyklus Arrest, die Differenzierung, die Proliferation, die Migration, und die Inflammation [70]. Der Zell-Zyklusarrest wird unter anderem von downstream targets von PPAR γ , den CDK-Inhibitoren p18, p21 und p27 reguliert [45, 71]. Zudem hat PPAR γ Einfluss auf den G1/S-checkpoint durch Inhibition der Phosphorylierung von Retinoblastom (Rb) [72] und Transkriptionsaktivitätsminderung des E2F/DP Komplexes [73]. Im Nierenzellkarzinom [74] und im Pankreaskarzinom [75] konnte bereits durch eine PPAR γ -Aktivierung die Induktion des Zell-Zyklus-Arrests erreicht werden.

Für das Mammakarzinom konnte zudem eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem Proliferationsmarker Ki-67 und der PPAR γ -Expression nachgewiesen werden, was einen Hinweis für die antiproliferative Eigenschaft von PPAR γ darstellt [76]. Widersprüchlich zu

diesen Ergebnissen vergrößerte Pioglitazon in einer anderen Studie das Tumolvolumen im Mausmodell signifikant. Auch der Proliferationsmarker Ki-67 zeigte eine stärkere Expression in den Xenografts der Treatment Gruppe [77]. Im Blasenkarzinom führte eine Steigerung der Aktivität von PPAR γ durch gain-of-function Mutationen zum Tumorwachstum [78]. Pro Tumor Eigenschaften von PPAR γ konnten darüber hinaus in Hirnmetastasen beobachtet werden. Der PPAR γ -Antagonist T0070907 senkte signifikant die Tumorzellproliferation [79].

PPAR γ scheint womöglich Einfluss auf den Differenzierungsstatus von Tumoren zu haben. In in-vitro Experimenten führte eine PPAR γ Aktivierung zu einer erhöhten Expression von Molekülen wie E-Cadherin, Alkalischer Phosphatase oder Keratin. Diese sind vor allem in gut differenzierten Zellen stark exprimiert, im Vergleich zu eher undifferenzierten Tumorzellen [50].

Außerdem konnten bisherige Untersuchungen zeigen, dass PPAR γ Liganden über eine Expressionssteigerung von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und Bak und einer Inhibierung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl2 die Apoptoseinduktion bewirken [80]. Widersprüchlich dazu konnte in Endothelzellen die LPS induzierte Apoptose durch die Gabe von Rosiglitazon verhindert werden [81]. Auch konnte in Neuroblastomzellen, durch die Gabe von Rosiglitazon die Apoptose durch Hochregulierung von Bcl-2 und Bcl-xl inhibiert werden [82]. In Zelllinien des KRKs (HT29) konnte hingegen durch Rosiglitazon ein Anstieg der Apoptoserate sowie der Expression der Caspase 3 beobachtet werden [83]. Auch in Zellen des hepatozellulären Karzinoms konnten PPAR γ -Liganden die Aktivität der Caspase 3 steigern [84]. Die Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, welche in ihrer aktivierten Form zur Induktion der Apoptose führen kann [85]. Darüber hinaus wird berichtet, dass die Apoptose durch PPAR γ Liganden, über eine Runterregulierung von Survivin, die Unterdrückung von NF κ B und die Stimulierung des Krüppel-like factors eingeleitet wird [86]. In Zellkulturexperimenten mit HT29 und HCT-116 Zellen konnte die Gabe von Rosiglitazon/5-FU verglichen mit alleiniger 5-FU Gabe die frühe Phase der Apoptose signifikant steigern [87].

Die Migration sowie die Proliferation von Tumorzellen wird unter anderem durch PPAR γ -vermittelte Hochregulierung des Tumorsuppressorgen Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN) blockiert. PTEN inhibiert die Phosphorylierung durch die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinase) und Proteinkinase B (AKT) und verhindert darüber die Aktivierung des Akt-Signalwegs, welcher Migration, Proliferation und Zellüberleben fördert [45, 88]. Entgegen diesen Ergebnissen führte die Überexpression von PPAR γ im Prostatakarzinom zur Expressionssteigerung von Akt3 mit der Folge der Tumorprogression [89]. Die Tumordinvasion konnte von PPAR γ -Agonisten, beispielsweise über die Runterregulation von MMP-7, MMP-2, MMP-9 und der Induktion von MMP-Inhibitoren, gehemmt werden [45, 90].

Die EMT erlaubt den Zellen invasive Fähigkeiten zu entwickeln und ist Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren. PPAR γ scheint in den Prozess der EMT einzugreifen [45]. In Zelllinien für das Lungen- und Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass die TGF- β induzierte EMT durch Gabe von Troglitazon und Rosiglitazon gehemmt werden konnte [90]. TGF- β spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von zellulären Signalwegen, die Einfluss auf das Zellwachstum, die Apoptose, die Differenzierung und die Immunreaktion haben [21]. TGF- β ist in zahlreichen Karzinomen stärker exprimiert und mit erhöhter Invasivität und Metastasierung assoziiert [90]. Für das KRK konnte, verglichen mit normaler Kolonmukosa, immunhistochemisch eine stärkere Expression von TGF- β nachgewiesen werden [91]. PPAR γ -Aktivierung schwächte in Zelllinien des Lungenadenokarzinoms die TGF- β induzierte

Suppression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin ab und unterband eine gesteigerte Expression von Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin. Diese Beobachtungen zeigen, dass PPAR γ die EMT möglicherweise blockiert, indem es sowohl den Verlust des epithelialen Phänotyps sowie den Erwerb von mesenchymalen Eigenschaften verhindert [90]. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung von PPAR γ in myeloischen tumorumgebenden Zellen zur Produktionssteigerung von TGF- β und darüber zur Progression von epithelialen Lungenkarzinomen und zur Förderung der EMT [92]. Über die Aktivierung des FABP-PPAR γ -Signalwegs konnte außerdem eine Förderung der EMT im Prostatakarzinom beobachtet werden [93]. Im Mausmodell für CED konnte gezeigt werden, dass der PPAR γ -Agonist GED-0507-34-Levo (GED) die Expression des mesenchymalen Markers Fibronectin sowie die der Moleküle IL-13, TGF- β und Smad3 senken kann. Außerdem normalisierte GED die Expressionslevel von E-Cadherin und β -Catenin und erhöhte die der Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β). GSK-3 β scheint die EMT zu hemmen, indem es den Transkriptionsfaktor Snail, welcher ein sehr bekannter EMT-Aktivator ist, inhibiert [94]. Sowohl die GSK-3 β als auch β -Catenin sind wichtige Bestandteile des WNT-Signalwegs, dessen Rolle unter Punkt 1.4.4 erläutert wird [47]. NF κ B spielt eine wichtige Rolle für die Verknüpfung zwischen chronischer Inflammation und Tumorentwicklung. Neben der Hochregulierung von zahlreichen tumorstimulierenden Zytokinen, wie IL-6, IL- α , und TNF- α , fördert es die EMT durch Aktivierung von Snail und Twist [21]. In neueren Studien wird PPAR γ eine hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NF κ B nachgesagt [46, 47]. Zusammenfassend wurden in der Literatur bisher sowohl hemmende, als auch fördernde Effekte von PPAR γ auf die EMT beschrieben.

Endotheliale Zellmigration ist ein essentieller Prozess für die Angiogenese [95]. Die Induktion der Angiogenese wird über pro- und antiangiogene Faktoren im Gleichgewicht gehalten. Veränderungen dieses Gleichgewichts können die Angiogenese in Tumoren fördern und das Tumorstadium begünstigen [96]. PPAR γ -Agonisten hemmen die VEGF induzierte endotheliale Zellmigration durch die Inhibierung des Akt-Signalwegs [97]. Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass PPAR γ möglicherweise die Angiogenese in KKR hemmen kann. So wurden in der Knockdown-Gruppe von PPAR γ signifikant mehr Fälle mit hoher Expression von VEGF beobachtet als in der Kontrollgruppe [98]. Allerdings konnte in Gefäßmuskulaturzellen sowie in Myofibroblasten eine Steigerung der VEGF-Expression vermittelt durch PPAR γ -Aktivierung beobachtet werden und somit eine Aktivierung der Angiogenese durch PPAR γ [99, 100].

Der signal transducer and activator of transcriptom 3 (STAT3) ist beteiligt an der Regulation der Proliferation, Tumorstadium, Migration und der Angiogenese. Troglitazon, ein PPAR γ Agonist, wird als Inhibitor für STAT3 vermittelte Signalwege angesehen. In Studien führten PPAR γ -Agonisten in Glioblastomen zur JAK/STAT-abhängige Apoptoseinduktion und zu einem Wachstumsarrest [67]. Für Zelllinien des KKR ist bekannt, dass Antagonisten von STAT3 zu einer gesteigerten Expression von E-Cadherin und einer reduzierten Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin und Vimentin führen [101].

Die bereits genannten tumorsuppressiven sowie tumorfördernden Eigenschaften von PPAR γ sind in Abbildung 7 zur Übersicht noch einmal zusammengefasst.

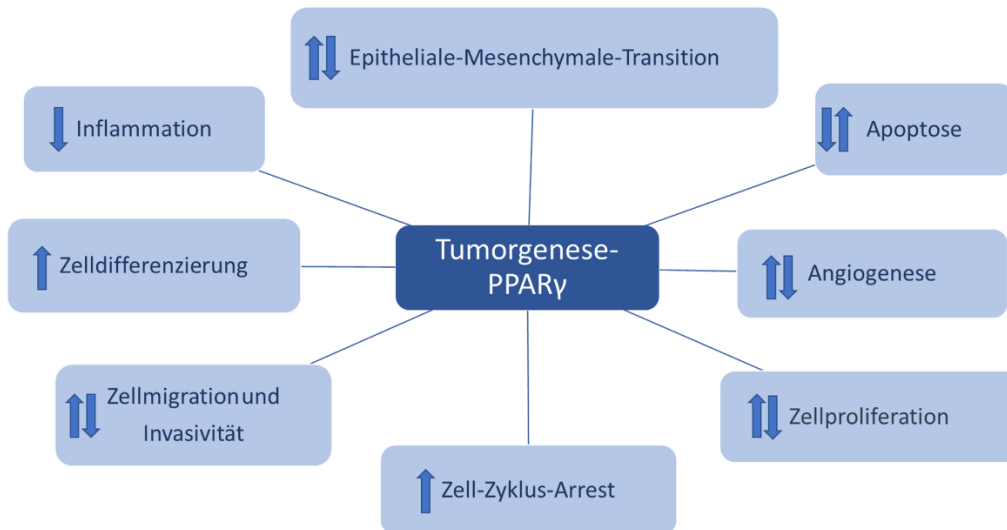


Abbildung 7: PPAR γ und Tumorgenese

1.4.4 PPAR γ und der Wnt-Signalweg

Der Wnt- β -Catenin Signalweg spielt eine wesentliche Rolle für die EMT, die embryologische Entwicklung und für das Zellschicksal [22]. Genetische und epigenetische Veränderungen des Wnt- β -Catenin Signalwegs spielen eine bedeutungsvolle Rolle in der Tumorgenese von KRK. Der Wnt-Signalweg wird aktiviert durch Ligandenbindung an einen Frizzled Rezeptor (FzD) in Anwesenheit eines Low Density Lipoprotein Corezeptors (LRP). Diese Interaktion löst einen kaskadenartigen Prozess aus. Das cytosolische Adapterprotein Disheveled (Dvl) begünstigt die Dissoziation eines Multikomplexes, den „destruction complex“, und ermöglicht darüber die Stabilisierung von β -Catenin und dessen Translokation in den Zellkern. Im Nukleus interagiert β -Catenin mit Mitgliedern von TCF und LEF und fördert die Expression von Zielgenen. Diese Targetgene sind wichtig für die Zelldifferenzierung, die Proliferation und die Angiogenese, unter anderem gehören dazu c-myc, cyclin D1, axin 2, CD44, PDK1, MCT-1 und Survivin. In Abwesenheit von Liganden ist β -Catenin an den „destruction complex“, bestehend aus APC, GSK3 β und Axin, gebunden und wird von der GSK-3 β und der Casein Kinase 1 (CK1) phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt zur Ubiquitinierung und letztendlich zum proteasomalen Abbau von β -Catenin [47, 67, 76]. Zur besseren Veranschaulichung ist der WNT-Signalweg in Abbildung 8 in seiner aktiven als auch in seiner inaktiven Form dargestellt [47].

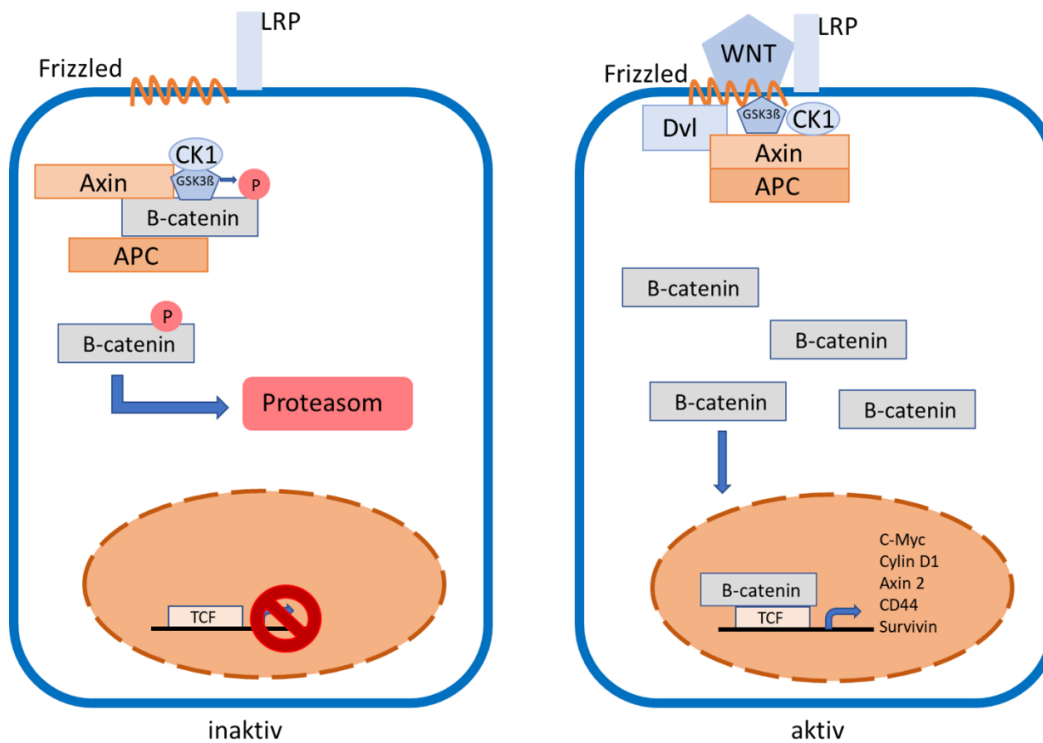


Abbildung 8: WNT-Signalweg [47]

Konstitutive Aktivierung des WNT-Signalwegs führt vermittelt über TCF/LEF zu Zellproliferation, Migration und Angiogenese. Außerdem konnte für das KRK gezeigt werden, dass die Aktivierung des Signalwegs, unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit, den sauerstoffabhängigen Stoffwechsel verringert und die Laktatproduktion steigert [22, 51]. Bei KRK kommt es häufig durch eine Mutation im APC-Gen zu einer übermäßigen Aktivierung des WNT-Signalwegs und somit zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von β -Catenin [9]. Dieses wird mittels direkter Interaktion mit Kernporen-Komplexen in den Zellkern transportiert [102]. Nukleäre Anhäufung von β -Catenin fördert den Prozess der EMT und ist ein nützlicher Biomarker, der mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit KRK vergesellschaftet ist [47]. Die nukleäre Akkumulation von β -Catenin ist zudem mit der gesteigerten Progression und Metastasierung von KRK assoziiert [103].

Der PPAR γ -Rezeptor übt möglicherweise eine tumorsuppressive Wirkung aus und ist mit dem Wnt- β -Catenin Signalweg verknüpft. Die Interaktion zwischen dem Wnt-Signalweg und PPAR γ basiert auf einer TCF/LEF β -Catenin Domäne und einer Cateninbindungsdomäne innerhalb von PPAR γ . Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zu einer Inhibierung von PPAR γ , während eine Aktivierung von PPAR γ zu einer Inhibierung des Wnt-Signalwegs in zahlreichen zellulären Systemen führt. Die beiden Systeme arbeiten also in Opposition. In normalen Zellen unterdrückt PPAR γ die Karzinogenese, indem es Einfluss auf phosphoryliertes β -Catenin im Proteasom nimmt [70]. Durch Supprimieren von β -Catenin kann PPAR γ die Tumorgenese von KRK in Zellen mit einem funktionierenden Wnt-Signalweg inhibieren [47]. Onkogenes β -Catenin dagegen entgeht dem proteasomalen Abbau durch Inaktivierung von PPAR γ [70]. Mutationen in der TCF/LEF Bindungsdomäne in onkogenem β -Catenin führen zu einer verringerten Interaktion zwischen PPAR γ und β -Catenin. Aufgrund dessen kann vor allem eine frühe Behandlung mit PPAR γ -Agonisten, vor der eigentlichen Tumorentwicklung, die Tumorentstehung womöglich verhindern [22]. Glitazone, PPAR γ -Agonisten, verringern die

Expression von β -Catenin abhängig von PPAR γ [67]. In den Zelllinien HT29 und CaCo2 konnte nach Gabe von 20 μ M Rosiglitazon, eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression von β -Catenin nachgewiesen werden [104]. PPAR γ Agonisten aktivieren die GSK-3 β und senken darüber die Expression von β -Catenin [70]. Außerdem konnte für das Mammakarzinom bereits eine signifikante inverse Korrelation zwischen der PPAR γ und β -Catenin immunhistochemischen Reaktivität gezeigt werden [76]. Des Weiteren inhibieren PPAR γ Agonisten den STAT3- und den PI3K/Akt Signalweg. Dies wiederum führt zur Aktivitätsminderung des WNT- β -Catenin Signalwegs und somit zur verringerten Proliferation, Invasivität und Angiogenese [67]. Die Hemmung des PI3K-Signalwegs reduziert die Aktivität des WNT-Signalwegs durch die Inhibierung der β -Catenin vermittelten Transkription, hat aber keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin [105]. Zudem aktivieren PPAR γ -Agonisten das Protein Dickkopf-1 (DKK1), welches ein Antagonist des WNT-Signalwegs ist [106]. DKK1 bindet an den LRP-Rezeptor und führt darüber zur cytosolischen Degradation von β -Catenin und verhindert TCF-vermittelte Gentranskription [107].

Diese Ergebnisse deuten in der Gesamtheit auf eine tumorsuppressive Wirkung von PPAR γ durch Einflussnahme auf den Wnt-Signalweg hin [70, 98].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die große Heterogenität der Gesamtheit der KRK, mit unterschiedlichem Therapieansprechen in verschiedenen Subtypen, macht leicht zu erhebende Parameter mit prognostischer Aussagekraft erstrebenswert [108]. Angesichts der bisher beschriebenen Zusammenhänge zwischen dem KRK und DM-Typ-II war das Ziel der Arbeit die folgenden Fragestellungen zu untersuchen.

1. Welche Art von Korrelation besteht zwischen dem Faktor PPAR γ und dem „Tumor spezifischen Überleben“, bzw. klinisch-pathologischen Parametern bei Patienten mit KRK und inwieweit wird diese von einem vorliegendem oder fehlendem DM-Typ-II beeinflusst?
2. Ist die Einnahme von Glitazonen bei Patienten mit KRK und DM-Typ-II mit längerem Überleben und/oder mit geringerem Metastasierungsrisiko assoziiert?
3. Eignet sich der HbA1c-Wert als prognostischer Marker bei Patienten mit KRK und DM-Typ-II?
4. Welchen Einfluss hat die Aktivierung bzw. die Inhibierung von PPAR γ auf die Zellviabilität von kolorektalen Zelllinien? Kann dieser Effekt gegebenenfalls therapeutisch nutzbar gemacht werden, zum Beispiel durch den Einsatz von PPAR γ -Agonisten in Patienten mit KRK? Wie verhält sich die Gabe von PPAR γ -Agonisten bzw. Inhibitoren in Kombination mit Standardchemotherapeutika?

2 Studienkollektiv, Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv

Für diese Arbeit wurden 246 Gewebeproben aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), die bereits in Formalin fixiert und in Paraffin gebettet waren, von Patienten mit KRK analysiert. Ausgewählt wurden diese anhand einer systemischen Suche in der Datenbank des Tumorregisters München (TRM). Patienten mit parallelen Zweitmalignomen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Studie wurde als Fall-Kontroll-Studie angelegt, sodass für jede Kohorte eigene Suchbegriffe festgelegt wurden. Für die Pulmonale Kohorte (PUL) wurden die Stichwörter „Kolorektales Karzinom“ und „ausschließlich Lungenmetastase“, für die Hepatische Kohorte (HEP) „Kolorektales Karzinom“ und „ausschließlich Lebermetastase“ und für die Kontrollgruppe ohne Organmetastasen (M0) „Kolorektales Karzinom“ und „keine Organmetastase“ verwendet. Für die pulmonale und die hepatische Gruppe wurden alle Patienten aus den Jahren 1998 bis 2017 mit histologisch oder radiologisch bestätigter Metastasierung eingeschlossen. Die Kontrollgruppe ohne Metastasierung wurde aus Fällen zusammengestellt, die dem TRM zwischen den Jahren 1998 und 2012 gemeldet wurden. Der gewählte Zeitraum für die M0 Gruppe diente der Sicherstellung eines mindestens fünf Jahre andauernden, Rezidiv-freien Überlebens in der Kontrollgruppe. Die Fälle in den drei Gruppen wurden anhand der Tumorlokalisation, dem Tumorgrading und dem pT-Stadium paarweise zugeordnet. Insgesamt ergaben sich drei Kohorten mit jeweils 82 Patientenfällen [109].

Zu den jeweiligen Präparaten wurden klinische Daten, wie der HbA1c-Wert, die Diabetesdiagnose, die Einnahme von Diabetesmedikamenten und der BMI aus dem Tumorregister München akquiriert. Diese werden in den folgenden Abschnitten zum Teil noch ausführlicher beschrieben. Aus Vorarbeiten am selben Kollektiv sind bereits retrospektive „follow-up“-Daten, wie die Metastasierung, Tumorspezifisches Überleben, Rezidiv sowie das Expressionsniveau bekannter Gene, die eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen, bekannt. Diese wurden in die Analysen miteinbezogen.

2.2 Erfasste Parameter

2.2.1 Diabetesdiagnose und Diabetestherapie

Für alle Patienten wurde zunächst erfasst, ob diese zusätzlich zu dem KRK an der Stoffwechselerkrankung DM erkrankt sind. Mögliche Ausprägungen der Variablen waren „keine Erkrankung“, „DM-Typ-I“ und „DM-Typ-II“. Wenn die Patienten an DM erkrankt waren, wurde noch differenziert, ob diese Erkrankung bereits vor dem KRK bekannt war oder erst nach der Erstdiagnose KRK aufgetreten ist. Bei allen Patienten wurde des Weiteren erfasst, ob sie Medikamente zur Therapie von DM eingenommen haben. Die Therapeutika wurden in Wirkstoffgruppen eingeteilt. Für die einzelnen Untergruppen wurde zusätzlich dokumentiert, welches Präparat die Patienten erhalten haben. Zur besseren Übersicht sind die erfassten Arzneimittel in Tabelle 3 dargestellt. Bezüglich der Insulinpflichtigkeit wurde nur zwischen „Ja“ und „Nein“ differenziert.

Wirkstoffgruppe	Präparate
Biguanide	Metformin
Thiazolidindione	Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon
Sulfonylharnstoffe	Glibenclamid, Tolbutamid, Glibornurid, Gliclazid, Glimepirid
Glinide	Repaglinid, Nateglinid
SGLT2-Inhibitoren	Dapagliflozin, Empagliflozin, Ertugliflozin, Canagliflozin, Sotagliflozin
GLP-1 Analoga	Albiglutid, Dulaglutid, Exenatid, Liraglutid, Lixisenatid, Semaglutid
Gliptine	Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin
α-Glucosidase-Inhibitoren	Acarbose, Miglitol, Voglibiose
Insulin	Ja/Nein

Tabelle 3: Diabetesmedikation

2.2.2 HbA1c

Neben der Diabeteserkrankung wurde der HbA1c Wert als Marker für die Hyperglykämie für das gesamte Kollektiv von KRK mit einer Nachkommastelle erfasst. AGEs können durch hohe Blutglucosespiegel entstehen, dabei kommt es zur nicht-enzymatischen Glykierung von NH₂-Gruppen von Proteinen. Auch Hämoglobin kann bei hohen Glucosekonzentrationen spontan glykiert werden. Durch Bestimmung des HbA1c Wertes lässt sich somit das Ausmaß der Hyperglykämie beurteilen und die Therapieadhärenz des Patienten prüfen [110]. Für Menschen mit Typ 2 Diabetes sollten individualisierte Therapieziele bezogen auf den HbA1c Wert festgelegt werden. Dabei sollten Aspekte wie Alter, Komorbidität, Nutzen-Risiko-Profil der eingesetzten Substanz, Art der eingesetzten Therapie sowie die Patientenpräferenz nach Aufklärung berücksichtigt werden. Zur Prävention von Folgeerkrankungen sollte ein HbA1c-Korridor zwischen 6.5 % bis 7.5 % angestrebt werden [15].

2.2.3 Überlebensdaten

Zur Analyse des Überlebens der Patienten wurde das Overall Survival (OS) wie folgt definiert: Das OS ist die Zeit zwischen der Erstdiagnose des KRKs und dem letzten Follow Up Datum bzw. dem Todesdatum. Der Tod wurde als Ereignis festgelegt.

2.3 Methoden

2.3.1 Immunhistochemie

2.3.1.1 Immunhistochemische Färbung von PPAR γ

Immunhistochemie dient dem Nachweis von Gewebestrukturen, meist Proteinen, aus histologischen Gewebeproben. Dabei werden an spezielle Epitope bindende Antikörper eingesetzt. Mittels verschiedener Detektionssysteme kommt es zur Anfärbung und somit zum Nachweis der Zielstrukturen [111]. Für die nachfolgend beschriebene Färbung wurde das ImmPress Horse Anti-Rabbit IgG Kit zur Detektion genutzt. Es ist ein enzymatisches, Biotin unabhängiges Amplifikationssystem.

Es wurde zudem eine Negativkontrolle ohne Antikörper sowie eine Isotypkontrolle zur Spezifitätsprüfung angefertigt.

Entparaffinierung:

Zur Vorbereitung der Färbung müssen die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte in Glasschaukeln 30 Minuten in Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, Aqua dest) für je fünf Minuten eingetaucht.

Antigendemaskierung:

Die Vorbehandlung erfolgte mit dem Target Retrieval Solution zur Epitop-Demaskierung und somit Verstärkung der Antikörperfärbung. Das Produkt wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest verdünnt. Die Kochzeit betrug zweimal 15 Minuten bei 750 Watt in der Mikrowelle. In der Pause wurden die Küvetten mit Aqua dest aufgefüllt, um einer Siderung des Puffers entgegenzuwirken. Danach wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Zur Wiederherstellung des optimalen pH-Wertes wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Puffer (TRIS: 0,05 M eingestellt auf pH 7,5, 43,9 g NaCl + 34,25 g TRIS-HCL + 4,5 g TRIS-Base, aufgefüllt auf fünf Liter Aqua dest) gelagert.

Blockade der endogenen Peroxidase:

Die endogen vorkommende Peroxidase im Gewebe wurde durch Inkubation der Schnitte in 7,5 % wässrigem Wasserstoffperoxid für zehn Minuten bei RT blockiert. Dieser Schritt ist notwendig, um eine spätere Hintergrundfärbung durch das Horseradish Enzym zu verringern [112]. Zur Auswaschung des Überschusses wurden die Schnitte unter fließendem Wasser für zehn Minuten gewässert. Danach erfolgte durch zweimal fünfminütige Spülung mit dem TRIS-Puffer die Wiederherstellung des pH-Wertes.

Färbeprozess:

Zunächst erfolgte die Aufsättigung unspezifischer Proteinbindungen mit dem in dem ImmPRESS Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Kit enthaltenen Normal Horse Serum 2,5 % für 20 Minuten bei RT. Der Überstand wurde abgekippt und die Reste manuell entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 60 Minuten mit dem Primärantikörper PPAR γ bei RT. Bei dem Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen. Die Färbung des Gesamtkollektivs wurde mit zwei verschiedenen Chargen des Antikörpers vorgenommen. In der Ersten war das Verhältnis von Antikörper zum Antikörperverdünnungsmedium bei 1:100, für die zweite Charge lag das Verhältnis bei 1:150.

Zum pH-Angleich erfolgte die erneute zweimalige Spülung für fünf Minuten im TRIS-Puffer. Der Zweitantikörper Anti-Rabbit IgG aus dem ImmPRESS Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Kit wurde nachfolgend für 30 Minuten auf die Schnitte aufgetragen. Nach abschließender Spülung für zweimal fünf Minuten mit dem TRIS-Puffer erfolgte die Anfärbung mit Chromogen Diaminobenzidin + (DAB). Dieses wurde für drei Minuten auf die Präparate appliziert. Zur Entfernung des überschüssigen Chromogens wurden die Schnitte zehn Minuten unter fließendem Wasser gespült. Das entstehende Enzymprodukt stellt sich im Schnitt gelbbraunlich dar. Nach der Hematoxylin Gill's Formula erfolgte die Gegenfärbung für zehn Sekunden. Nach diesem Schritt wurde erneut zehn Minuten fließend gewässert.

Eindecken der Schnitte:

Abschließend wurden die Schnittpräparate mit Aquatex von der Firma Merck händisch eingedeckt.

2.3.1.2 Auswertung der Expression mittels H-Score

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop und wurde von zwei unabhängigen Beobachtern (Jens Neumann, Leah Schöckel) durchgeführt. Die immunhistochemische Auswertung erfolgte unabhängig der Gruppen in zufälliger Reihenfolge und ohne Wissen über den klinischen Verlauf der Patienten. Zur Evaluation der PPAR γ Expression wurde der H-Score verwendet. Er berücksichtigt zum einen die Intensität der Färbung. Diese wird in vier Stufen eingeteilt, wobei null keiner Anfärbung der Zellkerne entspricht, eins einer schwachen Färbung, zwei einer mäßigen Färbung und drei einer starken Färbung. In Abbildung 9 sind in 200-facher Vergrößerung die Stufen der vier Farbintensitäten dargestellt. Bild A entspricht keiner Färbung, Bild B zeigt eine schwache Färbung, Bild C stellt eine mäßige Färbung dar und Bild D eine starke Färbung.

Zum anderen basiert der H-Score auf den Anteilen der vorkommenden Farbintensitäten in 5 % Schritten. Der endgültige Score berechnet sich aus der Summe der Produkte von Farbintensität und Verhältnis.

H-Score = 0*Anteil keine Färbung+1*Anteil schwache Färbung+2*Anteil mäßige Färbung+3*Anteil starke Färbung

Insgesamt ergeben sich Score Werte zwischen 0 und 300. Präparate mit Werten gleich bzw. oberhalb des Medians werden der Gruppe „high expression“ zugeordnet, Schnitte unterhalb des Medians der Gruppe „low expression“ [113, 114]. Abbildung 10 zeigt beispielhaft einen Tumor mit einer niedrigen Expression (Bild A) sowie einen Tumor mit einer hohen Expression (Bild B) von PPAR γ . Die Bilder wurden 200-fach vergrößert aufgenommen.

Alle Schnitte, die einen Wert mit einer Entfernung von ± 20 vom Median haben, wurden zur Überprüfung wiederholt ausgewertet. Diese Auswertung erfolgte ohne Wissen des Score-Wertes aus der Erstausswertung.

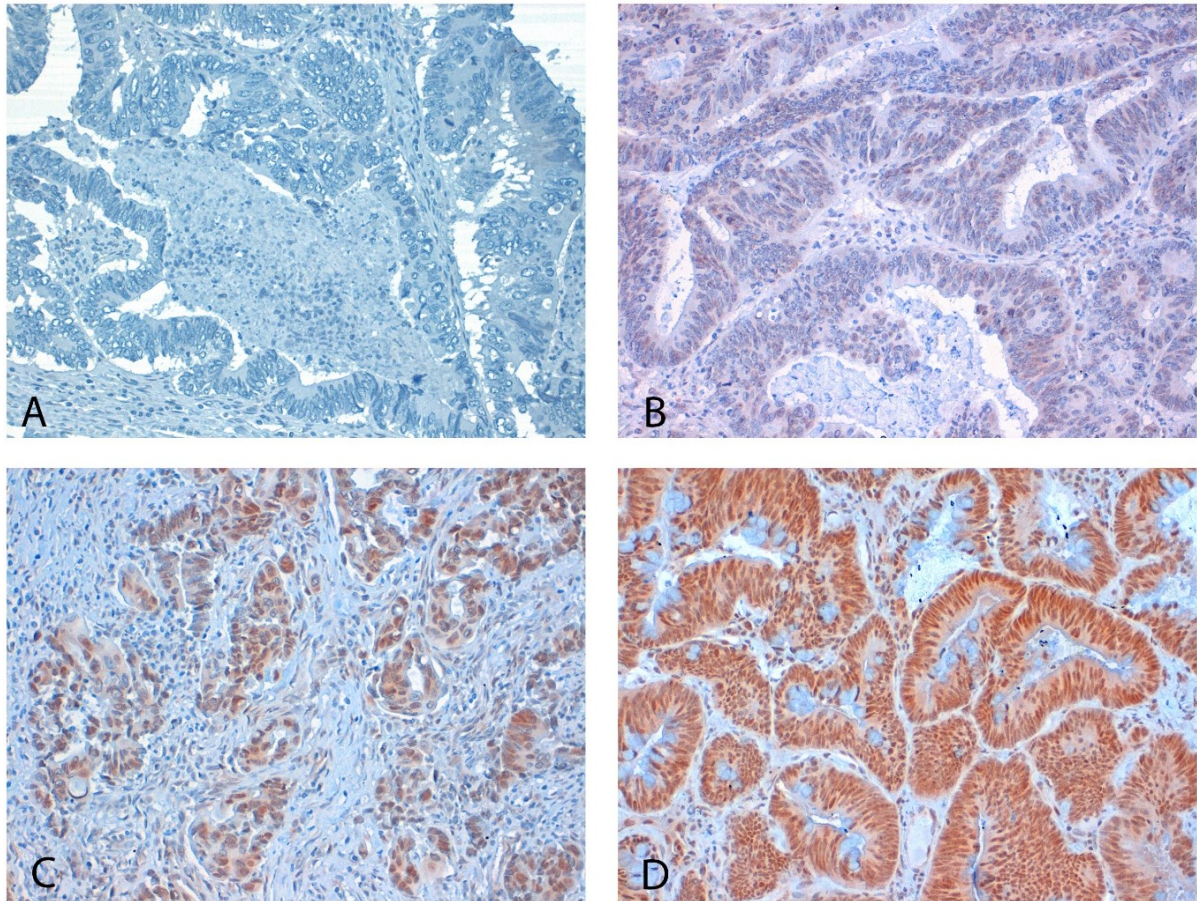


Abbildung 9: H-Score; A=keine Färbung, B=schwache Färbung, C=mäßige Färbung, D=starke Färbung, 200-fache Vergrößerung

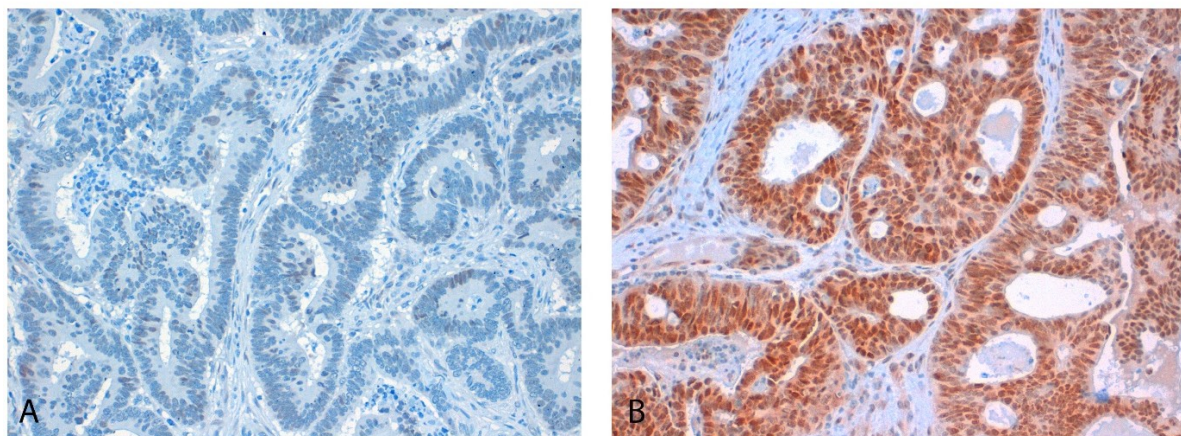


Abbildung 10: PPAR γ Expression: A=low, B=high, 200-fache Vergrößerung

2.3.2 Zellkultur

2.3.2.1 Zelllinien

Für die anschließend beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden mittels der Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) Zelllinien des KRKs ausgesucht, die das PPAR γ -Gen stark exprimieren (siehe Tabelle 4). Der Expressionsstatus der Zelllinien wurde sowohl auf Proteinebene mittels Western-Blot als auch auf RNA-Ebene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Alle Zelllinien stammen aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder aus der American Type Culture Collection (ATCC). Die Zelllinien sind ausschließlich adhärent wachsende Zellen.

Zelllinien	Firma
SW403 (ACC294)	DSMZ, Braunschweig, DE
HT29 (ACC299)	DSMZ, Braunschweig, DE
SW837 (CCL-235)	ATCC, Manassas, US
SW480 (ACC313)	DSMZ, Braunschweig, DE
SW620 (CCL-227)	ATCC, Manassas, US
LoVo (ACC 350)	DSMZ, Braunschweig, DE
HCT116 (ACC 581)	DSMZ, Braunschweig, DE
SW48 (CCL-231)	ATCC, Manassas, US
SW1116 (CCL-233)	ATCC, Manassas, US

Tabelle 4: Zelllinien

2.3.2.2 Standardkulturbedingungen, Passagieren und Einfrieren von Zelllinien

Kultivierung:

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ mit konstanter Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturinkubator. Alle Arbeitsschritte wurden steril in einer „Laminar air flow Werkbank“ durchgeführt. Als Zellkulturmedium wurde das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einer Glucosekonzentration von 4500 mg/L verwendet. Außerdem wurden dem Medium Fetal Bovine Serum (FBS) im Verhältnis 1:10 sowie Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml/10 µg/ml; P/S) hinzugesetzt. Das Medium wurde nach Begutachtung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop mindestens dreimal in der Woche gewechselt. Dazu wurde das alte Medium mit einer Pipette abgesaugt um nicht-adhären wachsende tote Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mittels phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und neues Medium hinzu pipettiert.

Passagieren der Zellen:

Die Zellen wurden spätestens im Stadium der Subkonfluenz (80-90 %) passagiert. Dazu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der adhären-wachsenden Zellen erfolgte mittels 1 ml Trypsin/EDTA Solution. Dieses wurde vorsichtig in die Zellkulturflasche gegeben und für zwei bis fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Kontrolliert wurde die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche mit dem Phasenkontrastmikroskop. Bei unvollständiger Ablösung wurde die Inkubationszeit verlängert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 5 ml (T-25) bzw. 15 ml (T-75) Medium gestoppt. Die entstandene Dispersion

wurde in ein Falconröhrchen überführt und für zwei Minuten bei 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand des Röhrchens wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 1 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellsuspension wieder in Flaschen ausgesät und ausreichend Medium in die Zellkulturflaschen hinzugefügt. Der Rest der Suspension wurde in Experimenten eingesetzt bzw. verworfen.

Auftauen/Einfrieren der Zellen:

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryobehälter aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen. Im Wasserbad (37 °C) wurden die eingefrorenen Zellen langsam aufgetaut und das Eppendorfgefäß anschließend äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Zellsuspension wurde in temperiertes (37 °C) DMEM (versetzt mit 10 % FBS und P/S) übertragen und anschließend bei 100 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet wurde in 6 ml bzw. 18 ml Medium resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde in einer Zellkulturflasche (T25 bzw. T75) ausplattiert. Nach 24 bis 48 Stunden wurde die Vitalität der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt und das Medium ausgetauscht.

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellen wie beim Passagieren zum Ablösen trypsiniert und im Anschluss zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Suspension erneut zwei Minuten mit 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift dient der vollständigen Elimination von Trypsinresten. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium (DMEM mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Zum Einfrieren wurde die Suspension in ein Kryoröhrchen übertragen und in einen Einfrierbehälter, gefüllt mit Isopropanol (Kühlungsrate -1 °C/Minute), zur schonenden Abkühlung auf -80 °C gegeben. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

Test auf Mykoplasmen Kontamination:

Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen geprüft. Nur „mykoplasmenfreie“ Kulturen wurden in Experimente eingesetzt. Die Testung erfolgte mittels PCR nach dem „Detection of Mycoplasma in cell cultures“ Protokoll von Nature protocols [115]. Tabelle 5 zeigt die in der PCR verwendeten Primersequenzen.

MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
GPO-3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT

Tabelle 5: Primersequenzen

Zellzählung:

Zur Synchronisation der verschiedenen Zelllinien und für einen Teil der Experimente wurden die Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden wie beim Passagieren trypsiniert und nach dem Zentrifugieren in Kulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden 10 µl dieser Suspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau in einem Eppendorfgefäß gemischt. Dies ermöglichte eine einfache Differenzierung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen. Von dieser Suspension wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Es wurden jeweils vier Eckquadranten in fester Reihenfolge unter einem

Lichtmikroskop ausgezählt und der dazugehörige Mittelwert (\bar{n}) gebildet. Die endgültige Berechnung der Zellzahl pro ml erfolgte anhand nachfolgender Formel:

$$\bar{n} \times 10^4 \times 2 = \text{Zellzahl/ml}$$

Der Faktor zwei (Verdünnungsfaktor) entsteht durch die Verdünnung mit Trypanblau. Für die einzelnen Experimente wurde dieser Wert zur Kalkulation des einzusetzenden Volumens genutzt.

2.3.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den Zellkulturen wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA Kits (Macherey-Nagel GmbH) analog zu den Herstellerangaben durchgeführt. Der Lysepuffer (350 μ l) wurde dabei direkt nach dem Waschen mit kaltem PBS auf die Zellen gegeben. Bei Experimenten mit Messungen des RNA-Niveaus zu verschiedenen Zeitpunkten wurden zunächst Zellpellets gewonnen und diese bis zum Abschluss der Zeitreihe bei -80 °C gelagert. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und im Anschluss mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Pellets eingefroren. Die RNA-Extraktion aus den Zellpellets erfolgte dann zeitgleich nach Herstellerangaben.

2.3.3.2 Vermessung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Nukleosinsäure-Konzentration wurde das Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Messung der Konzentration erfolgte mittels Bestimmung der Absorption einer Probe (1 μ l) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm. Zu Beginn wurde ein Leerwert des Elutionsmediums (Nuklease-freies-Wasser) gemessen. Im Anschluss wurden die eigentlichen Proben vermessen. Das Gerät zieht dabei den Leerwert selbständig von den für die Proben gemessenen Werten ab. Die Konzentration wird im Anschluss automatisch von dem Gerät berechnet. Als Grundlage dient die Lambert-Beer-Gleichung.

$$c = A \cdot \epsilon \cdot d$$

c=Konzentration

A=Absorption

ϵ =Extinktionskoeffizient

d=Schichtdicke

Die Schichtdicke ist bereits vom Gerät vorgegeben. Der Extinktionskoeffizient liegt für doppelsträngige DNA bei $\epsilon = 50 \text{ ng}/(\text{cm} \cdot \mu\text{l})$ und für einzelsträngige RNA bei $\epsilon = 40 \text{ ng}/(\text{cm} \cdot \mu\text{l})$. Der Quotient aus den verschiedenen Messungen bei 260 nm und 280 nm liefert Information über eine mögliche Verunreinigung der Probe. Nach Herstellerangaben sollte der Quotient für DNA größer 1.8 und für RNA größer zwei sein. Niedrigere Werte liefern Hinweise auf eine Verunreinigung der Probe zum Beispiel mit Proteinen.

2.3.3.3 cDNA-Synthese

Um das Expressionsniveau von PPAR γ auf mRNA-Ebene zu bestimmen, wurde zunächst die gesamte gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das cDNA Synthesis Kit von ThermoScientific genutzt (RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit). Als Primer wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Die eingesetzte RNA-Menge lag bei 1 μ g. Es wurde immer mit zwei negativ- (Probe ohne RNA bzw. Probe ohne Reverse Transkriptase) und einer positiv-Kontrolle (GAPDH-Kontroll-RNA) gearbeitet. Alle Schritte zur Umschreibung der RNA in cDNA erfolgten nach Herstellerangaben.

2.3.3.4 Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Zur Messung der verschiedenen Expressionsniveaus der mRNA wurde nach erfolgtem Umschreiben der gesamten RNA zu cDNA (siehe Abschnitt 2.3.3.3) ein PCR-Ansatz erstellt. Es wurde mit einer finalen cDNA-Gesamtmenge von 15 ng pro Ansatz und mit einem Endvolumen von 15 μ l gearbeitet. Alle Proben wurden in Triplets vermessen. Die PCR wurde mit dem LightCycler LC480 von Roche durchgeführt.

qPCR-Ansatz:

cDNA (2.73 ng/ μ l):	5.5 μ l
SYBR-Green-Mastermix:	7.5 μ l
Primermix (2.5 μ M):	2 μ l

Reaktionsbedingungen:

Amplifikation (40 Wiederholungen):

20 s	95 °C
1 s	95 °C
20 s	60 °C
1 s	72 °C

Schmelzkurve:

10 s	98 °C
60 s	60 °C
5 min	98 °C

Abkühlen:

30 s	40 °C
------	-------

Der Mittelwert (Triplets) der Schwellenwert Zyklen (=crossing point, CP) der einzelnen Proben wurde nach der $\Delta\Delta$ -CP-Methode [116] auf die CP-Werte des Referenz Gens (GAPDH) normalisiert und mit den Ergebnissen der Kontroll-Experimente verglichen. Die verwendeten Primer Sequenzen für die qRT-PCR befinden sich in Tabelle 6.

GAPDH	Forward	5' CTCAACAGCGACACCCACT 3' (20)
	Reverse	5' CTGGTCCAGGGGTCTTACTC 3' (20)
PPAR γ	Forward	5' GCCCAAGTTTGAGTTTGCTG 3' (20)
	Reverse	5' TCAATGGGCTTCACATTCAGC 3' (21)
SOD1	Forward	5' CTCACTCTCAGGAGACCATTGC 3' (22)
	Reverse	5' CCACAAGCCAAACGACTTCCAG 3' (22)
GPX1	Forward	5' TGCTCGGCTTCCCGTGCAACCAGT 3' (25)
	Reverse	5' GGTGATGAGCTTGGGGTTCGGTCAT 3' (25)
CAT	Forward	5' GTGCGGAGATTCAACACTGCCA 3' (22)
	Reverse	5' CGGCAATGTTCTCACACAGACG 3' (22)
UCP2	Forward	5' CTACAGCCAGCGCCAGTA 3'(20)
	Reverse	5' TCAGTACGCACCATGGTCAGA 3' (21)
PTEN	Forward	5' CTCAGCCGTTACCTGTGTGT 3' (20)
	Reverse	5' AGGTTTCTCTGGTCCTGGT 3' (20)
BAX	Forward	5' TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG 3' (22)
	Reverse	5' TGTGTCCACGGCGGCAATCATC 3' (22)

Tabelle 6: Primersequenzen qPCR

2.3.4 Protein-basierte Methoden

2.3.4.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion aus Zellkulturen wurde zunächst das Kulturmedium von den Zellkulturplatten entfernt und im Anschluss die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen. Durch Absaugen wurden alle PBS Reste entfernt. Im nächsten Schritt wurde der Protein-Lysepuffer auf die Zellkulturplatte gegeben (100 μ l bei einer Plattengröße von 6 cm²). Der Proteinpuffer („triple detergent lysis buffer“) wurde nach Maniatis et al.[117] zubereitet und auf Eis gelagert. (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % NaN₃, 0.5 % Na-Desoxycholat, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, 10x Phosstop Phosphataseinhibitoren-Cocktail, 7x Complete Proteaseinhibitorencocktail). Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen von der gesamten Oberfläche abgelöst. Die gesamte Suspension wurde in ein 1.5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die anschließende Sonifizierung der Proben erfolgte für fünf Sekunden bei einer Amplitude von 75 %. Zur Abtrennung des nicht gelösten Zelldetritus wurde die Proben danach zentrifugiert (15 min, 4 °C, 14.800 x g). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert und für weitere Analysen genutzt oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

2.3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Proben wurde mittels dem DC Protein Assay System (Biorad) strikt nach Herstellerangaben bestimmt. Die Proteinkonzentration wird dabei über die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm ermittelt. Die Intensität der Blaufärbung der Proben ist dabei proportional zu der in der Probe enthaltenen Proteinkonzentration. Die Eichkurve wurde mittels einer Standardreihe aus im Wasser gelösten bovinem Serumalbumin (BSA) mit sieben verschiedenen Konzentration (2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5,

0.25 und 0.125 mg/ml; BioRad) erstellt. Als Leerwert wurde der zur Erstellung der Proben verwendete Lysepuffer vermessen. Bevor die Proben im Mikroplatten-Photometer (Varioscan Flash Microplate reader, Thermo) vermessen wurden, mussten die angefertigten Proben 15 Minuten inkubieren. Der Absorptionswert des Leerwerts wurde dann von der Absorption der Proben abgezogen. Anhand der Eichkurve, die auf der Absorption der Standardreihe basiert, wurde mit nachfolgender Formel die Proteinkonzentration x in $\mu\text{g/ml}$ bestimmt.

$$x = \frac{f(x) - b}{m}$$

$f(x)$ =Absorption der gemessenen Probe

b =Achsenabschnitt ($x=0$)

m =Steigung der Eichkurve

2.3.4.3 Western Blot-Analyse

Puffer und Lösungen:

(4x) Tris-HCl-pH 6.8

6.05 g Tris-Base in 40 ml H₂O

0.4 g SDS

ad 100 ml H₂O

pH 6.8 mit 1N-HCl

(4x) Tris-HCl-pH 8.8

91.0 g Tris-Base in 300 ml H₂O

2.0 g SDS

ad 500 ml H₂O

pH 8.8 mit 1N-HCl

(5x) Running buffer (Laemmli = TGS)

15.1 g Tris Base

72.0 g Glycin

5.0 g SDS

ad 1000 ml H₂O

(10x) Transferpuffer (= TG)

30.2 g Tris-Base

144.2 g Glycin

Ad 500 ml H₂O

(10x) TBS

15.76 g Tris/HCl

7.57 g NaCl

ad 1000 ml H₂O

pH 7.5 mit NaOH

(10x) TBS/T

1000 ml 10x TBS
10 ml Tween-20

Blotto

100 ml TBS/T
5 g fettfreies Trockenmilchpulver

SDS-PAGE:

Für die nicht-denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde ein Trenngel mit folgender Zusammensetzung gegossen.

Acrylamid 30 %	5 ml
4xTris-HCl, pH 8.8	3.75 ml
H ₂ O	6.25 ml
APS	200 µl
TEMED	40 µl
	= 15 ml

Das Gel wurde mit einer Pipette zwischen zwei Glasplatten einer PAGE-Vorrichtung gegeben und um Luftblasen zu entfernen im Anschluss mit 70 % Ethanol bedeckt. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Ethanol mit einem Filterpapier entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Die Zusammensetzung des Stacking Gels war wie folgt:

Acrylamid 30 %	650 µl
4xTris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
H ₂ O	3.05 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED	20 µl
	= 5 ml

Um die Probestaschen zu bilden, wurde direkt nach Einfüllen des Stacking Gels der Kamm eingesetzt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurden die Gele in die mit Running Buffer gefüllte Gellaufkammer eingespannt. Die Probestaschen wurden gespült und das Gel mit den Proben beladen. Diese wurden wie folgt vorbereitet:

Abhängig von der Proteinkonzentration der Lysate wurde die Menge des Ladepuffers (SDS 8 % w/v, β-Mercaptoethanol 20 % v/v, Glycerin 40 % v/v, Bromphenolblau 0.015 % w/v, phosphatgepuffert) bestimmt um alle Proben auf das gleiche Volumen zu bringen. Insgesamt wurden jeweils 25-30 µg Gesamtprotein, versetzt mit dem Ladepuffer, in einem Heizblock bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt und im Anschluss zentrifugiert, auf Eis gesetzt und geladen. Der Proteingrößenmarker wurde dabei in die erste Tasche geladen. Das Gel wurde bis die Proben das Trenngel erreicht haben (circa 20 Minuten) bei 80 V laufen gelassen. Im Anschluss lief es weitere 60-90 Minuten bei 120 V, bis das Bromphenolblau des Ladepuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Zum Blotting wurde eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) für 15 s in Methanol eingeweicht und anschließend mit Wasser gespült. Anschließend wurde die Membran, die Blotting-Schwämme und Whatman-Papiere für einige Minuten in den Transferpuffer (10 % MeOH, 10 % 10x Buffer, 80 % H₂O) gegeben. Das Sandwich in der Blotting-Kassette wurde in folgender Reihenfolge zusammgebaut: Schwarze Kassettenseite,

Blotting-Schwamm, Whatman-Papier, Gel, PVDF-Membran, Whatman-Papier, Blotting-Schwamm, Durchsichtige Kassettenseite. Die Kassette wurde verschlossen und in die Blotting Kammer eingesetzt. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde zusätzlich ein Kühlelement in die Kammer eingebaut. Die Kammer wurde dann mit Transferpuffer aufgefüllt und das Blotting bei 300 mA für circa 90 Minuten gestartet. Dabei wurde durch eine Kühlbox die Temperatur zwischen 4-10 °C gehalten. Im Anschluss wurde die Membran aus dem Sandwich entnommen und die korrekte Übertragung des Proteingrößenmarkers überprüft. Um den Proteintransfer zu kontrollieren, wurde die Membran in Wasser getaucht und im Anschluss für fünf Minuten in Ponceau-S Lösung, unter Agitation auf dem Orbitalschüttler, gegeben. Die überschüssige Lösung wurde abgegossen und die Membran so lange in Wasser gewaschen, bis sich die Proteinbanden rosarot darstellten. Anschließend konnte mit der Blockierung der Membran begonnen werden. Die Membran wurde für eine Stunde bei RT in 5 % Blocking Solution (Blotto) geblockt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS/T gewaschen und über Nacht bei 4 °C unter ständiger Agitation mittels eines Rollschüttlers mit der Primärantikörperlösung (siehe Tabelle 7) inkubiert. Die Primärantikörperlösung wurde durch Zugabe von Natrium-Azid (Endkonzentration: 200 µg/ml) haltbar gemacht und mehrfach verwendet. Nach Abschluss der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran erneut dreimal mit TBS/T für jeweils zehn Minuten gewaschen und bei RT mit dem in Blocking Solution gelösten Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS/T unter ständiger Agitation wurde die Membran mit 1 ml ECL Lösung nach Herstellerangaben bedeckt und zwischen zwei durchsichtige Folien für fünf Minuten gelegt. Mit dem Imager (Li-COR Odyssey Fc) wurden mit unterschiedlich langer Belichtungszeit (30 s bis zehn Minuten) Fotos von der Membran gemacht. Um eine erneute Antikörperfärbung derselben Membran durchzuführen, wurde die Membran bei 37 °C für eine halbe Stunde auf dem Orbitalschüttler in eine gebrauchsfertige Stripping-Lösung gegeben. Danach konnte erneut mit dem Blockieren begonnen werden. Zur längerfristigen Lagerung wurde die Membran nach dem Stripping in Methanol getaucht, luftgetrocknet und anschließend im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Antigen	Verdünnung	Verdünnungsmedium
PPAR γ	1:1000	TBS/T mit 5 % BSA
CK20	1:1000	5 % Blocking Solution
β -Aktin	1:30.000	5 % Blocking Solution

Tabelle 7: Antikörper Western Blot

2.3.5 Zellbiologische Methoden

2.3.5.1 Transfektion

Der transiente Gen-Knockdown von PPAR γ wurde basierend auf dem Prinzip der RNA-Interferenz mit einem siPool der Firma Biotech durchgeführt. Die Verwendung eines siPools anstelle von einzelnen siRNA erhöht die Spezifität des Knock-Downs [118]. Die finale Endkonzentration des siPools wurde mit 2 nM möglichst geringgehalten. Zur Durchführung der Transfektion wurde zunächst die siPool dilution sowie die RNAiMax dilution wie in Tabelle 8 hergestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein well einer 6-well Platte.

siPool dilution	248 μ l Optimem	2 μ l siPool predilution stock (1 μ M)
RNAiMAX dilution	246 μ l Optimem	4 μ l Lipofectamine

Tabelle 8: Transfektionslösung

Für die Kontrollgruppe wurde anstatt dem siPool predilution stock die ctrlRNA (1 μ M) verwendet. Die beiden Lösungen wurden jeweils fünf Minuten bei RT inkubiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:1 miteinander gemischt. Der Transfektionsmix (500 μ l pro well) wurde nun für weitere fünf Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben. Diese wurden zuvor mit einer Konzentration von 12.000.000/ml ausgesät, wobei ein Volumen von 500 μ l in jedes well gegeben wurde. Die Zellkulturexperimente wurden 24 Stunden nach der Transfektion gestartet.

2.3.5.2 Read-Out PPAR γ Agonisten

Um zu zeigen, dass die in den Zellkulturexperimenten eingesetzten PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon und Pioglitazon über die Bindung an PPAR γ wirken, haben wir ein bekanntes Zielgen von PPAR γ (CK20) [119] 48 Stunden nach Zugabe des Treatments (20 μ M) auf Proteinebene mittels WB gescreent.

2.3.5.3 Resazurin-Zellviabilitäts-Assay

Zur Beurteilung der Zellviabilität nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Treatments zur Untersuchung des Einflusses von PPAR γ auf die Proliferation von kolorektalen Zelllinien wurde Resazurin eingesetzt. Resazurin ist ein Redox-Farbstoff, der in lebensfähigen Zellen mit aktivem Metabolismus durch Reduktion in das fluoreszierende Resofurin umgesetzt wird [120]. Die Auswertung des Assays erfolgte mittels Mikrotiterplattenphotometer vier Stunden nach dem Hinzusetzen des Resazurins. Von den absoluten Werten mussten zur finalen Auswertung noch die Leerwerte (100 μ l Medium + 10 μ l Resazurin) abgezogen werden.

Die nachfolgenden Konditionen gelten für alle Zellviabilitäts-Assays. Es wurden 96-well Platten verwendet. Das Endvolumen pro well lag bei 100 μ l. Alle Treatments/KD/Ctrl-Subgruppen wurden mindestens in technischen Triplikaten pipettiert. Aufgrund unterschiedlicher Proliferationsraten wurden bei Versuchsbeginn für die Zelllinie SW403 5000 Zellen pro well und für die HT29 2000 Zellen pro well eingesetzt.

KD vs. Kontrolle:

Zu Beginn wurde, wie in Abschnitt 2.3.5.1 beschrieben, der transiente KD in 6-well-Platten in jeder Zelllinie durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert und das Zellpellet mit dem entsprechenden Volumen zur Erreichung der exakten Zielzellzahl erneut resuspendiert. Für jeden Messzeitpunkt (24 h, 48 h, 72 h) müssen zum Zeitpunkt null eigene Triplikate angesetzt werden. 24, 48 bzw. 72 Stunden nach dem Aussähen in die 96-well-Platte wurden 10 μ l Resazurin (0.2 mg/ml) in jedes well gegeben. Zur statistischen Beurteilung wurde der gepaarte t-test verwendet.

Austestung der Treatment Konzentration:

Um die optimale Konzentration für die verschiedenen Behandlungen in den nachfolgenden Assays festzulegen, wurden für Pioglitazon, Rosiglitazon und GW9662 dosisabhängige Wachstumskurven erstellt. Dabei wurden folgende Konzentrationen ausgetestet.

Rosi bzw. Pioglitazon: 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM

GW9662: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM und 100 μM

Die Auswertung erfolgte 72 Stunden nach Treatmentzugabe mittels Zugabe von 10 μl Resazurin (0.2 mg/ml). Auf Basis dieser Information wurde die Konzentrationen für alle nachfolgende Zellviabilitäts-Assays festgelegt.

Treatment:

Zunächst wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Nach Zählung der Zellen wurden diese mit dem entsprechenden Volumen des Treatment-Mediums zum Erreichen der exakten Zielzellzahl resuspendiert. Folgende Konzentrationen wurden dabei verwendet:

Rosiglitazon 20 μM ,
Pioglitazon 20 μM ,
DMSO

Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu dem „KD vs. Kontroll-Assay“.

Hypoxieschrank:

Zur Beurteilung der PPAR γ -Funktion unter hypoxischen Bedingungen wurde das Hypoxie-Assay wie folgt durchgeführt. Die Behandlungs-Subgruppen wurden analog zu den Abschnitten „KD vs. Kontrolle“ und „Treatment“ vorbereitet. Im Allgemeinen wurden folgende Treatment-Subgruppen ausgesät:

KD-PPAR γ ,
Kontrolle-PPAR γ ,
Rosiglitazon 20 bzw. 80 μM ,
Pioglitazon 20 bzw. 80 μM ,
GW9662 10 μM ,
DMSO

Das Endvolumen lag bei 100 μl pro well. Alle Subgruppen wurden zu Beginn in doppelter Ausführung pipettiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde die Hälfte der 96-well-Platten in einen Hypoxieschrank für weitere 72 Stunden gegeben. Die anderen Platten wurden für den gleichen Zeitraum unter Normoxie behandelt. Im Anschluss wurden 10 μl Resazurin (0.2 mg/ml) in jedes well gegeben. Zur statistischen Beurteilung wurde der gepaarte t-test angewandt.

Elesclomol:

Um die Relevanz von PPAR γ in Bezug auf die Protektion vor Reaktiven Sauerstoffspezies zu klären, wurde nachfolgendes Assay pipettiert. Elesclomol induziert in Mitochondrien selektiv ROS [121]. Zunächst wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Nach Zählung der Zellen wurden diese mit dem entsprechenden Volumen des Treatment-Mediums resuspendiert. Nachfolgende Konzentrationen der jeweiligen Treatments wurden verwendet.

Rosiglitazon 20 bzw. 80 μ M,
Pioglitazon 20 bzw. 80 μ M,
GW9662 10 μ M,
DMSO

Des Weiteren wurden, wie zuvor beschrieben, Zellen mit bzw. ohne KD ausgesät. Dabei wurde immer mit einem finalen Volumen von 80 μ l pro well gearbeitet. Nach 24 Stunden wurden 20 μ l des Elesclomol Treatments hinzugegeben. Es wurde mit folgenden Zielkonzentration gearbeitet: 10 μ mol/l; 1 μ mol/l; 0.1 μ mol/l; Diese wurden als absteigende Zehnerreihe pipettiert. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. Nach weiteren 72 Stunden wurden 10 μ l Resazurin (0.2 mg/ml) in jedes well gegeben. Zur statistischen Beurteilung wurde der gepaarte t-test angewandt.

CTX-5-Fluorouracil

Zur Untersuchung des Einflusses von PPAR γ Agonisten bzw. Inhibitoren auf die Chemotherapiesensitivität von 5-FU, wurde folgendes Assay angesetzt. Zu Beginn wurden die Zellen analog zu dem Elesclomol-Assay in 96-well-Platten ausgesät. Dabei wurden die folgenden Behandlungsgruppen gewählt.

Rosiglitazon 80 μ M,
Pioglitazon 80 μ M,
GW9662 10 μ M,
Kontrolle

Dabei wurde immer mit einem finalen Volumen von 80 μ l pro well gearbeitet. Die Behandlung mit 5-FU erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Dazu wurden 20 μ l Medium mit entsprechenden Volumen 5-FU hinzugegeben, um nachfolgende 5-FU-Zielkonzentrationen zu erreichen.

100 μ mol/l;
50 μ mol/l;
10 μ mol/l;
5 μ mol/l;
1 μ mol/l;
0.5 μ mol/l
0.1 μ mol/l;
0.01 μ mol/l;
0.001 μ mol/l;

Diese wurden als absteigende Zehnerreihe pipettiert. Für jede Konzentration und Behandlungsgruppe wurde in Triplikaten gearbeitet. Nach weiteren 72 Stunden wurden zur Beurteilung der Zellviabilität 10 µl Resazurin (0.2 mg/ml) in jedes well gegeben. Zur statistischen Bewertung wurden die IC50 der jeweiligen Behandlungsgruppe berechnet und mittels gepaartem t-test verglichen.

2.3.5.4 ROS-Zielgene

Um mögliche Erklärungen für die untersuchten funktionellen Eigenschaften von PPAR γ in Bezug auf den Schutz vor Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu finden, wurden mittels qPCR bekannte Zielgene des oxidativen Stresses (SOD1, GPX1, CAT, UCP2) untersucht [122]. Dazu wurden die Zellen in einer 6-well-Platte für 48 Stunden mit DMSO, Pioglitazon 80 µM, Rosiglitazon 80 µM und GW9662 10 µM behandelt. Zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion erreichten die Zellen eine 80 bis 90%ige Konfluenz. Die Primersequenzen der qPCR sind in Tabelle 6 aufgeführt.

2.3.6 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 26) durchgeführt. Die statistische Evaluation der Tumorcharakteristika und klinisch-pathologischen Daten wurde für die normalskalierten bzw. dichotomen Variablen mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Für die metrischen Variablen wurde zur Prüfung der Normalverteilung der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Anschließend erfolgt zur Testung der Signifikanz der Kruskal-Wallis-Test. Die Überlebenszeitanalysen wurden mittels des Kaplan-Meier-Schätzers beurteilt und mit Hilfe des Log-Rank-Tests auf Signifikanz getestet. Außerdem wurde zur Analyse des „Overall-Survivals“ eine Cox-Regression gerechnet. Für Voranalysen am „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) Kollektiv wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r berechnet. Für die Zellkulturexperimente wurden die verwendeten statistischen Tests bereits oben erwähnt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests zweiseitig auf $\alpha=0.05$ festgelegt. In den Graphiken wurde zur vereinfachten Darstellung der Signifikanzwerte mit Sternchen („*“) gearbeitet (siehe Tabelle 9).

P-Wert	
<0.05	*
<0.01	**
<0.001	***
<0.0001	****

Tabelle 9: Darstellung P-Werte

2.4 Material

Tabelle 10 zeigt das in der Arbeit verwendete Material.

Material	Firma
Immunhistochemie	
Dako Antibody Diluent	Dako North America Inc., Art. Nr. S3022, Carpinteria, USA
Ethanol (reinst)	CLN GmbH, Niederhummel, DE
Hematoxylin Gill's Formula	Vector Laboratories Inc., Art. Nr. 3401, Burlingame, USA
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako North America Inc., Art. Nr. K3468, Carpinteria, USA
Target Retrieval Solution	Dako North America Inc., Art. Nr. S1699, Carpinteria, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	CarlRoth, Art. Nr. 9681, Karlsruhe, DE
Xylol (reinst)	CLN GmbH, Niederhummel, DE
Zellkultur	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)- with high glucose, L-alanyl-glutamine and sodium bicarbonate, without sodium pyruvate, liquid, steril-filtered	SigmaAldrich, Art. Nr. D0819, München, DE
Fetales Kalbsserum, FBS, steril filtered	SigmaAldrich, Art. Nr. F0804, München, DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium	SigmaAldrich, Art. Nr. D8537, München, DE
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml & 10mg/ml	SigmaAldrich, Art. Nr. P4333, München, DE
Trypsin-EDTA Solution 1X	SigmaAldrich, Art. Nr. T4299, München, DE
DMSO, Dimethylsulfoxid	CarlRoth, Art. Nr. 4720.4, Karlsruhe, DE
Trypan Blue Solution (0.4 %)	SigmaAldrich, Art. Nr. T8154, München, DE
Proteinextraktion und Western Blot	
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma Aldrich, Art. Nr. A2153, München, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	CarlRoth, Art. Nr. 9178.2, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	CarlRoth, Art. Nr. A512.1, Karlsruhe, DE
Complete Proteaseinhibitoren Cocktail	Roche, Penzberg, DE
Glycerin	CarlRoth, Art. Nr. 6967.1, Karlsruhe, DE
Immobilon-P Polyvinylidenfluorid PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach, DE
Immobilon Chemiluminescent Substrate (ECL)	Millipore, Schwalbach, DE
Mercaptoethanol	ITW Reagents, Art. Nr. A1108, Darmstadt, DE
Methanol (Reag. USP, Ph. Eur.)	ITW Reagents, Art. Nr.131091, Darmstadt, DE
PageRuler PlusPrestained Protein Ladder 10-250 kDa	ThermoScientific, Art. Nr. 26619, Vilnius, LTU
PhosStop Phosphataseinhibitoren-Cocktail	Roche, Penzberg, DE
Ponceau-s-Lösung	Sigma Aldrich, Art. Nr. P7170, München, DE
Rotiphorese Acrylamid-Lösung	CarlRoth, Art. Nr. 3029.1, Karlsruhe, DE
SDS	CarlRoth, Art-Nr. 2326.4, Karlsruhe, DE

TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	CarlRoth, Art. Nr. 2367.1, Karlsruhe, DE
Trockenmilchpulver	SERVA, Art. Nr. 42590, Heidelberg, DE
Tween-20	Sigma Aldrich, Art. Nr. P1379, München, DE
Western Blot Stripping Buffer	Abcam, Art. Nr. ab270550, Berlin, DE
Weitere Grundstoffe (Salze, Puffer, etc.)	Sigma Aldrich, München, DE
Antikörper	
CK20 (WB)	Medacdiagnostika, Art. Nr. MOB123, Wedel, D
PPAR γ (WB)	Cell Signaling, Art. Nr. C26H12, Frankfurt, DE
PPAR γ (Immunhistochemie)	LSBio, Art. Nr. LS-E42027, Seattle, USA
Aktin (WB)	Sigma Aldrich, München, DE
PCR	
Agarose	CarlRoth, Art. Nr. 3810.3, Karlsruhe, DE
DNA Gel Loading Dye (6x)	ThermoScientific, Art. Nr. R0611, Vilnius, LTU
dNTP mix (10 mM)	ThermoScientific, Art. Nr. R0194, Vilnius, LTU
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	CarlRoth, Art. Nr. 2218.2, Karlsruhe, DE
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	ThermoScientific, Art. Nr. SM0313, Vilnius, LTU
HotStarTaq – DNAPolymerase (5000 U)	Qiagen, Art. Nr. 203207 (Kit), Germantown, USA
TAE (50x)	CarlRoth, Art. Nr. CL86.1, Karlsruhe, DE
10x CoralLoad PCR buffer	Qiagen, Art. Nr.203207 (Kit), Germantown, USA
Transfektion	
Lipofectamine RNAiMAX	ThermoScientific, Art. Nr. 13778, Vilnius, LTU
Opti-MEM Gibco (HEPES, 2.4 g/L Sodium Bicarbonate, L-Glutamine)	ThermoScientific, Art. Nr. 31985070, Vilnius, LTU
siPool PPAR γ	siPoolsbiotech, Planegg, DE
KITS	
DC Protein Assay Kit II	Bio Rad, Art. Nr. 5000112, München, DE
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Polymer Kit ImmPRESS Horse Anti Rabbit IgG	Vector Laboratories Inc., Art. Nr. MP-7401, Burlingame, USA
RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoScientific, Vilnius, LTU
SYBR- Select Master Mix	ThermoScientific, Art. Nr. 44729, Vilnius, LTU
Treatments und Chemikalien	
Elesclomol	MedChemExpress, Art. Nr. HY-12040, Monmouth Junction, USA
GW9662	SigmaAldrich, Art. Nr. M6191, München, DE
Mitomycin	CarlRoth, Art-Nr. 4150.1, Karlsruhe, DE
Oxaliplatin	LMU Klinikum Apotheke, München, DE
Pioglitazone	Targetmol, Art. Nr. T021, Wellesley Hills, USA
Resazurin	SigmaAldrich, Art. Nr. R7017, München, DE
Rosiglitazone	Targetmol, Art. Nr. T0334, Wellesley Hills, USA
5-Fluorouracil	LMU Klinikum Apotheke, München, DE

Tabelle 10: Material

2.5 Geräte

Tabelle 11 zeigt die in der Arbeit verwendeten Geräte.

Geräte	Firma
Alpha-Innotech Multiimager Light Cabinet	ProteinSimple, San Jose, USA
Eppendorf® ThermoStat Plus	Eppendorf GmbH, Hamburg, DE
Heracell™ 240i CO2-Inkubator	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Fresco21 Centrifuge	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Megafuge 40R	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Hood Maxisafe2020 1.2	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
HTU Soni130 Sonicator	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, DE
Li-COR Odyssey Fc	Li-Cor, Lincon, NE, USA
LightCycler480	Roche, Penzberg, DE
Magnetrührer RCT-Basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Mini SUB Cell-GT	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Mikrowelle, M8201-1	Bio-Rad Laboratories, München, DE
ND 1000 NanoDrop Spectrophotometer	Miele & Cie. KG, Gütersloh, DE
Neubauer Counting Chamber	NanoDrop Products, Wilmington, USA
POWER PAC 300	CarlRoth, Karlsruhe, Deutschland
Primovert Mikroskop	Bio-Rad Laboratories, München, DE
T100 Thermal Cycler	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE
Varioskan Multimode Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Vortex Genie2	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Tabelle 11: Geräte

2.6 Software

Tabelle 12 zeigt die in der Arbeit genutzte Software.

Software	Firma
Affinity Designer 1.9.0.932	Serif (Europe) Ltd, Nottingham, UK
Affinity Publisher 1.9.0.932	Serif (Europe) Ltd, Nottingham, UK
FluorChemFC2	ProteinSimple, San Jose, USA
Image Studio Ver 5.25	Li-Cor, Lincon, NE, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, USA
SkanIt Software 2.4.3 Research Edition	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Varioskan	
SPSS Statistics 26	IBM, New York, USA

Tabelle 12: Software

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Analysiert wurde eine Studienpopulation bestehend aus 246 Patientenfällen, wobei insgesamt 145 (58.9 %) Patienten männlichen und 101 (41.1 %) Patienten weiblichen Geschlechts sind. Die Geschlechterverteilung für die drei Kohorten ist in Tabelle 13 dargestellt. Mittels des Chi-Quadrats-Tests ($p=0.053$) konnte ein geschlechtsspezifisches Bias zwischen den Kohorten ausgeschlossen werden.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag der Median für das Alter in der gesamten Studienpopulation bei 67 Jahren. Für die nicht metastasierten Fälle lag der Median bei 71 Jahren, für die pulmonal metastasierte Gruppe bei 64 Jahren und für die hepatisch metastasierte Kohorte bei 63 Jahren. Der Altersunterschied zwischen den einzelnen Gruppen war auf einem Niveau von $p<0.001$ hoch signifikant. Diesem p-Wert liegt der Kruskal-Wallis-Test zugrunde. Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde die Variable Alter zuvor auf Normalverteilung getestet. Die Nullhypothese, dass das Alter normalverteilt ist, musste abgelehnt werden.

Der Primärtumor war bei 108 (43.9 %) Patienten im Kolon, bei 22 (8.9 %) im Rektosigmoid und bei 116 (47.2 %) im Rektum lokalisiert. Nach dem Grading-Schema der WHO waren 166 (67.8 %) Fälle zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der „low grade“ Gruppe zuzuordnen, 79 (32.2 %) der „high grade“ Gruppe. Das T-Stadium wurde nach der TNM Klassifikation festgelegt, zwei (0.8 %) Fälle waren zum Zeitpunkt der Probeentnahme für die Pathologie T0, da Rektumkarzinome im Allgemeinen vorbehandelt werden [2]. Für die restlichen T-Stadien lag folgende Verteilung in absoluten und relativen Werten vor; T1=11 (4.5 %), T2=30 (12.2 %), T3=175 (71.2 %), T4=26 (10.6 %). Für weitere zwei Fälle war das T-Stadium retrospektiv nicht mehr bestimmbar. 125 (50.8 %) Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen Lymphknotenbefall, 115 (46.7 %) waren Nodal negativ und für sechs (2.4 %) Fälle ist der Lymphknotenstatus nicht erhoben worden.

Die Verteilung der Klinisch-Pathologischen Daten in den drei Kohorten sind in der Tabelle 13 zur besseren Übersicht zusammengefasst. Die p-Werte zum Vergleich der Kohorten wurden, so weit nicht bereits anders erwähnt, alle mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet. Für die Tumorlokalisation ($p<0.001$) und dem Lymphknotenbefall ($p=0.001$) wurden hoch signifikante p-Werte bestimmt.

Charakteristika	M0 (n=82)	PUL (n=82)	HEP (n=82)	P-Wert	
				Total	PUL vs HEP
Geschlecht					
männlich	40 (48.8)	55 (67.1)	50 (61.0)	0.053	0.416
weiblich	42 (51.2)	27 (32.9)	32 (39.0)		
Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose					
Median	71.0	64.0	63.0	<0.001*	0.274*
≥ 70	46 (56.1)	28 (34.1)	24 (29.3)	0.001 ^a	0.503 ^a
≥ 65	64 (78.0)	39 (47.6)	37 (45.1)	<0.001 ^b	0.755 ^b
< 65	18 (22.0)	43 (52.4)	45 (54.9)		

Tumorgrad					
Low grade (G2)	56 (68.3)	54 (65.9)	56 (68.3)	0.968	0.825
High grade (G3)	26 (31.7)	27 (32.9)	26 (31.7)		
Unbekannt	-	1 (1.2)	-		
pT-Stadium					
pT0	-	2 (2.4)	-		
pT1	4 (4.9)	3 (3.7)	4 (4.9)		
pT2	8 (9.8)	11 (13.4)	11 (13.4)	0.714	0.667
pT3	60 (73.2)	57 (69.5)	58 (70.7)		
pT4	10 (12.2)	7 (8.5)	9 (11.0)		
Unbekannt	-	2 (2.4)	-		
N-Status					
N-negative	52 (63.4)	32 (39.0)	31 (37.8)	0.001	0.544
N-positive	29 (35.4)	45 (54.9)	51 (62.2)		
Unbekannt	1 (1.2)	5 (6.1)	-		
Diabetes Typ II					
Nein	59 (72.0)	66 (80.5)	66 (80.5)	0.084	0.253
Ja	16 (19.5)	6 (7.3)	11 (13.4)		
Unbekannt	7 (8.5)	10 (12.2)	5 (6.1)		
Tumorlokalisation					
Kolon	51 (62.2)	25 (30.5)	32 (39.0)	<0.001	0.203
Rektosigmoid	6 (7.3)	6 (7.3)	10 (12.2)		
Rektum	25 (30.5)	51 (62.2)	40 (48.8)		
Tumorseite					
Rechtes Kolon	9 (11.0)	9 (11.0)	9 (11.0)	1.00	1.00
Linkes Kolon	73 (89.0)	73 (89.0)	73 (89.0)		
absolute Zahlen ohne Klammern, relative Werte mit Klammern (gilt in allen Tabellen)					
*p-Wert für Trennung nach dem Median, ^a p-Wert für ≥ 70 , ^b p-Wert für ≥ 65					

Tabelle 13: Charakteristika der Studienpopulation

Zusätzlich zu den pathologischen Parametern wurden klinische Daten mit besonderem Fokus auf die Erkrankung mit DM-Typ-II erhoben. 33 Patienten besaßen zum Zeitpunkt der KRK Diagnose eine DM-Erkrankung vom Typ II (Prävalenz 13.4 %), davon waren 30 medikamentös behandlungspflichtig. Die Mehrzahl der Patienten nahm als Therapeutikum Metformin ein, TZDs wurden von einem einzigen Patienten eingenommen, weitere Wirkstoffe mit Häufigkeitsverteilung sind in der Abbildung 11 dargestellt. Der HbA1c-Wert war retrospektiv nur für 20 Patienten erhebbar, wobei die Zeitspanne zwischen der Abnahme des Wertes und der Erstdiagnose nicht einheitlich erhebbar war. Auf dieser Grundlage waren keine aussagekräftigen statistischen Auswertungen durchführbar.

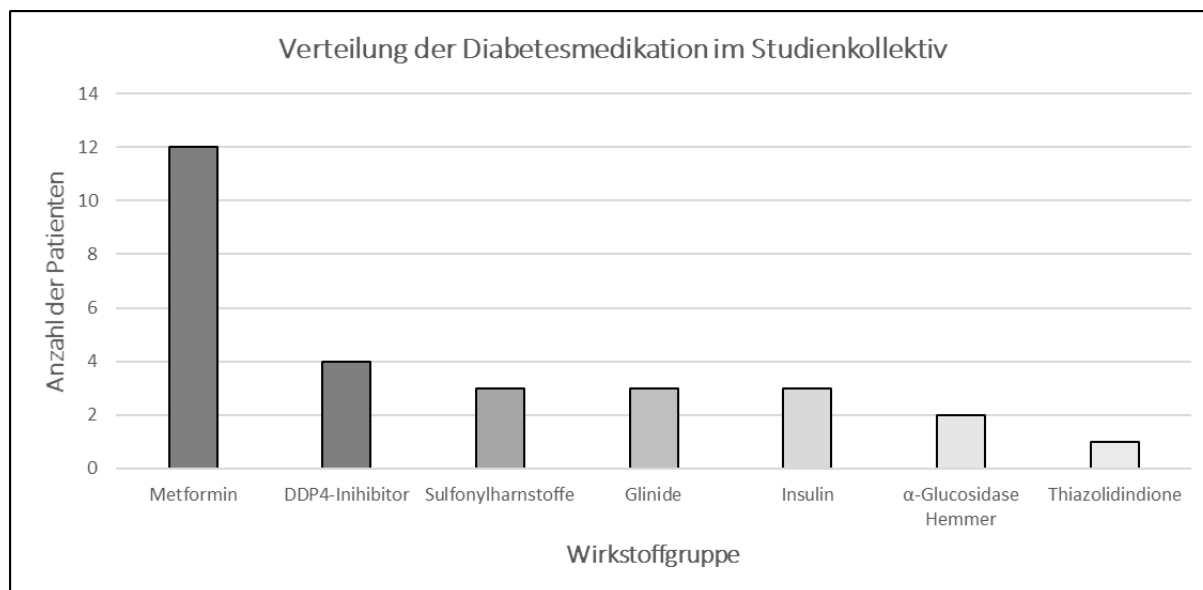


Abbildung 11: Verteilung der Diabetesmedikation im Studienkollektiv

3.2 Histopathologie

3.2.1 H-Score: PPAR γ Expression

Zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbung wurde, wie bereits unter Punkt 2.3.1.2 erwähnt, der H-Score verwendet. Im Gesamtkollektiv lag der Mittelwert für die Expression bei 136.2 und der Median bei 140. Anhand des Medians erfolgte auch die Einteilung in die zwei Gruppen, „low expression“ und „high expression“. Die männlichen Fälle hatten mit einem Mittelwert von 144.2 und einem Median von 155 im Durchschnitt stärker exprimierende Tumore als die weiblichen Erkrankten. KRK in weiblichen Patienten zeigten im Mittel einen Score von 124.8 und einen Median von 125. Die deskriptive Statistik des H-Scores ist in Tabelle 14 veranschaulicht. Außerdem sind die Daten zusätzlich graphisch als Box-Plot in Abbildung 12 dargestellt.

H-Score der PPAR γ Expression			
	Gesamt	männlich	weiblich
Mittelwert	136.2	144.2	124.8
Konfidenzintervall Mittelwert	127.6-144.8	132.9-155.5	111.6-138.0
Median	140	155	125
Minimum	0	0	5
Maximum	290	280	290
Standardabweichung	68.5	68.7	66.9
25 Perzentile	80	95	80
75 Perzentile	190	195	180

Tabelle 14: Deskriptive Statistik H-Score

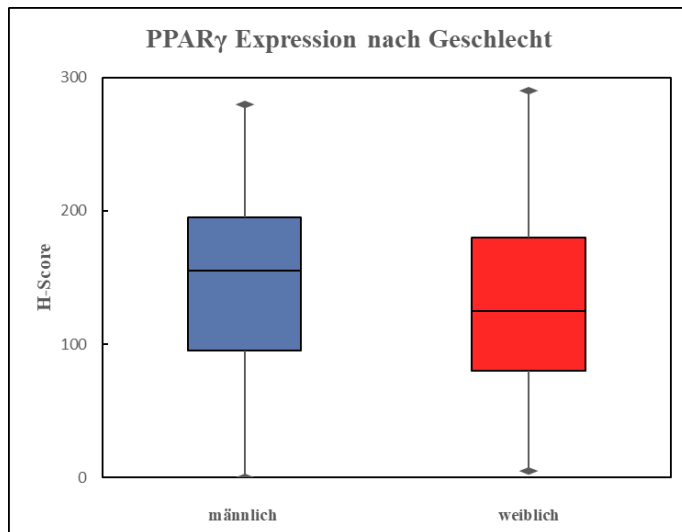


Abbildung 12: H-Score getrennt nach Geschlecht

Im nächsten Schritt wurde der Wert des H-Score bezogen auf die einzelnen Kohorten (M0, PUL, HEP) analysiert. Die pulmonale Kohorte zeigte mit einem Mittelwert von 156.9 und einem Median von 165 die höchsten Werte, gefolgt von der hepatischen Gruppe mit einem Mittelwert von 128.1 und einem Median von 132.5. Die nicht metastasierten Fälle hatten mit einem Mittelwert von 123.7 und einem Median von 122.5 die niedrigsten Werte. Der Unterschied in den Gruppen war mit einem p-Wert von **0.009** signifikant (Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich der einzelnen Kohorten lieferte nur der „M0 vs. PUL“ mit einem p-Wert von **0.011** ein signifikantes Ergebnis. Pulmonal metastasierte KKRK zeigten somit eine signifikant höhere Expression von PPAR γ [109]. Zur Veranschaulichung der Unterschiede des H-Scores bezogen auf den M-Status dient der Box-Plot in Abbildung 13.

H-Score der PPAR γ Expression			
	M0	HEP	PUL
Mittelwert	123.7	128.1	156.9
Median	122.5	132.5	165

Tabelle 15: H-Score in den Subkohorten

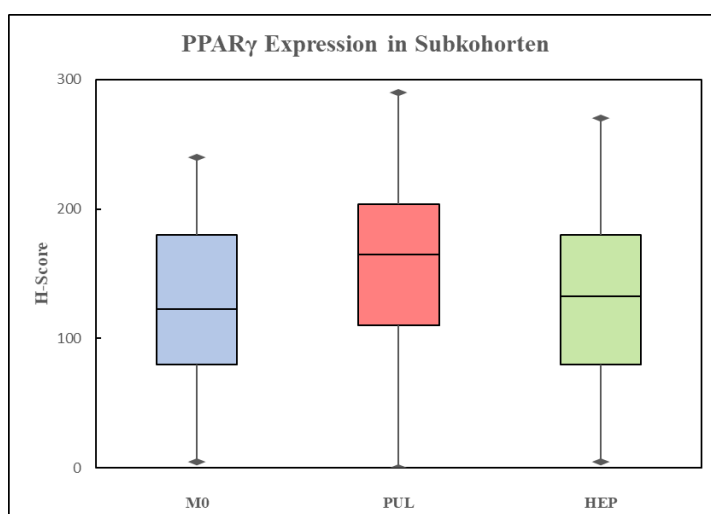


Abbildung 13: H-Score in den Subkohorten

3.2.2 Korrelation der PPAR γ Expression mit Klinisch-Pathologischen Parametern

Die mittels H-Score ermittelte PPAR γ -Expression wurde anschließend mit zahlreichen weiteren Klinisch-Pathologischen Daten korreliert. Die Analysen erfolgten alle auf der Basis der Einteilung in eine „low expression“ und eine „high expression“ Gruppe von PPAR γ und nicht mit dem Rohwert des H-Scores. Bezogen auf das gesamte Kollektiv zeigten 122 (49.6 %) Fälle eine niedrige Expression und 124 (50.4 %) eine hohe Expression von PPAR γ . Die nahezu Gleichverteilung entstand aufgrund der Definition der Gruppen anhand des Medians.

Der Altersmedian der gesamten Studienpopulation lag bei 67 Jahren. Anhand dessen wurde das Kollektiv in zwei Altersgruppen (≤ 66 bzw. ≥ 67) eingeteilt. Bezogen auf diese zwei Altersgruppen konnte keine Korrelation ($p=0.898$) mit der PPAR γ Expression nachgewiesen werden. Eine signifikante Korrelation ($p=0.005$) zeigte sich hingegen zwischen der PPAR γ Expression und dem Geschlecht. Männliche Patienten zeigten signifikant häufiger eine hohe Expression des Proteins PPAR γ , verglichen mit weiblichen Fällen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Rohdaten des H-Scores aus Abschnitt 3.2.1.

Zur Überprüfung, ob die Expression von PPAR γ eine Aussage über die Zelldifferenzierung zulässt, wurde die Expression mit dem Tumordifferenzierungsgrad korreliert. Von 166 (67.8 %) low-grade Tumoren waren jeweils genau 83 in der niedrig-/hochexprimierenden Gruppe. Auch in den high-grade Tumoren zeigte sich nahezu eine Gleichverteilung. 39 KRK zeigten eine schwache Expression und 40 KRK eine starke Expression. Die Expression von PPAR γ korrelierte folglich nicht ($p=0.926$) mit dem Tumordifferenzierungsgrad.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Expression von PPAR γ einen Zusammenhang mit dem pT-Stadium zeigt. Zur Ergänzung muss hier erwähnt werden, dass für einen kleinen Teil der KRK das ypT-Stadium als „pT“ Stadium verwendet wurde, da für Rektumkarzinome ab dem UICC-Stadium 2 eine neoadjuvante Therapie in der Leitlinie empfohlen wird [2]. Die Verteilung der Expression von PPAR γ gestaltete sich wie folgt: Im T1-Stadium zeigten sechs Patientenfälle eine niedrige Expression und fünf Fälle eine hohe Expression. KRK im T2-Stadium hatten in elf Fällen eine schwache und in 19 Fällen eine starke Expression von PPAR γ . Der Großteil der Tumore befand sich zum Zeitpunkt der Diagnose im T3-Stadium, wovon 91 Fälle PPAR γ schwach und 84 Fälle PPAR γ stark exprimierten. Karzinome im T4 Stadium zeigten in 14 Fällen eine schwache und in zwölf Fällen eine starke Expression. Als Resultat dieser Ergebnisse ergab sich ein p-Wert von 0.324. Die Expression von PPAR γ zeigte folglich keine signifikante Korrelation mit dem pT-Stadium der KRK.

Auch der Lymphknotenbefall wurde mit der Expression von PPAR γ korreliert. Die KRK die noch keine Infiltration in Lymphknoten zeigten, waren in 52.2 % ($n=60$) schwach exprimierende und in 47.8 % ($n=55$) stark exprimierende Tumore. Bei den Lymphknotenpositiven Fällen waren 59 (48.4 %) Schnitte schwach und 66 (53.2 %) Schnitte stark angefärbt. Diese nahezu Gleichverteilung der Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus spiegelt sich in dem p-Wert von 0.441 wider.

Im Hinblick auf die Tumorlokalisation sollte überprüft werden, ob Tumore im Rektum ein anderes Expressionsverhalten von PPAR γ haben als Primärtumore, die im Kolon lokalisiert sind. Von 108 Kolonkarzinomen waren 49 stark exprimierende und 59 schwach exprimierende Tumore. Im Rektosigmoid waren 14 Fälle stark angefärbt und acht Fälle schwach angefärbt. Innerhalb der Rektumkarzinome zeigte sich mit 59 niedrig exprimierenden und 57 stark

exprimierenden Tumoren eine nahezu Gleichverteilung. Insgesamt war der Unterschied bezogen auf die Tumorlokalisation mit einem p-Wert von 0.275 nicht signifikant.

Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen einer Diabeteserkrankung und dem Expressionsstatus von PPAR γ wurden nachfolgende Korrelationsanalysen durchgeführt. Insgesamt hatten 33 Patienten eine Diabeteserkrankung. In der Gruppe mit niedrig exprimierenden Tumoren waren 13 an DM erkrankt. 20 Fälle mit hoch exprimierenden KRK hatten DM-Typ-II. Diese Verteilung erreichte mit einem p-Wert von 0.249 keine statistische Signifikanz.

Die einzelnen Verteilungen sind zur besseren Übersicht in absoluten Zahlen sowie in relativen Zahlen noch einmal in Tabelle 16 dargestellt. Für alle p-Werte wurde der Chi-Quadrat-Test berechnet.

Charakteristika	Total	PPAR γ		P-Wert
		low	high	
Gesamte Studienpopulation	246 (100)	122 (49.6)	124 (50.4)	-
Alter (Median: 67)				
≤ 66	122 (49.6)	60 (49.2)	62 (50.0)	0.898
≥ 67	124 (50.4)	62 (50.8)	62 (50.0)	
Geschlecht				0.005
männlich	145 (58.9)	61 (50)	84 (67.7)	
weiblich	101 (41.1)	61 (50)	40 (32.3)	
Tumorlokalisation				0.275
Kolon	108 (43.9)	49 (40.2)	59 (47.6)	
Rektosigmoid	22 (8.9)	14 (11.5)	8 (6.5)	
Rektum	116 (47.2)	59 (48.4)	57 (46.0)	
T Stage (UICC)				0.324
T0	2 (0.8)	0 (0)	2 (1.6)	
T1	11 (4.5)	6 (4.9)	5 (4.1)	
T2	30 (12.2)	11 (9.0)	19 (15.3)	
T3	175 (71.2)	91 (74.6)	84 (67.7)	
T4	26 (10.6)	14 (11.5)	12 (9.7)	
Unbekannt	2 (0.8)	0 (0)	2 (1.6)	
Tumorgrad				0.926
Low grade	166 (67.8)	83 (68.0)	83 (67.5)	
High grade	79 (32.2)	39 (32.0)	40 (32.5)	
N-Status				0.441
N negativ	115 (46.7)	60 (49.2)	55 (44.4)	
N positiv	125 (50.8)	59 (48.4)	66 (53.2)	
Unbekannt	6 (2.4)	3 (2.5)	3 (2.4)	
Diabetes Mellitus II				0.249
Nein	191 (77.6)	96 (78.7)	95 (76.6)	
Ja	33 (13.4)	13 (10.7)	20 (16.1)	
Unbekannt	22 (8.9)	13 (10.7)	9 (7.3)	

Tabelle 16: Korrelation PPAR γ Expression und Klinisch-Pathologischer Parameter

Im nächsten Schritt wurde die PPAR γ Expression mit den Kohorten M0, PUL und HEP korreliert. In der M0 Gruppe zeigten 47 (57.3 %) eine niedrige Expression und 35 (42.7 %) eine hohe Expression von PPAR γ . In der Gruppe der pulmonal metastasierten Patienten hatten 32 (39 %) eine niedrige und 50 (61 %) eine hohe Expression. In der HEP-Kohorte war PPAR γ in 43 (52.4 %) niedrig und in 39 (47.6 %) hoch exprimiert. Diese Verteilung war mit einem p-Wert von 0.053, berechnet mit dem Chi-Quadrat-Test, gerade nicht signifikant. Allerdings lässt sich aus den absoluten Zahlen die Tendenz ablesen, dass vor allem die Kohorte mit Lungenmetastasen in einer Vielzahl an Fällen eine hohe Expression von PPAR γ zeigt (siehe Tabelle 17).

	Total (n=246)	M0 (n=82)	PUL (n=82)	HEP (n=82)	Global P
PPAR γ low expression	122 (49.6)	47 (57.3)	32 (39.0)	43 (52.4)	0.053
PPAR γ high expression	124 (50.4)	35 (42.7)	50 (61.0)	39 (47.6)	

Tabelle 17: PPAR γ Expression in den Subkohorten

Im direkten Gruppenvergleich zwischen der PUL- und M0-Kohorte zeigte sich eine signifikante Korrelation (**p=0.019**) zwischen der PPAR γ Expression und dem Vorhandensein von Lungenmetastasen. Eine hohe Expression von PPAR γ korrelierte signifikant mit der Metastasierung in die Lunge (siehe Tabelle 18). Im Einklang dazu stehen die Analysen der Rohdaten des H-Scores aus Abschnitt 3.2.1. Auch hier zeigte der H-Score der pulmonalen Fälle signifikant höhere Werte verglichen mit den nicht metastasierten Fällen [109].

	M0	PUL	P-Wert
PPAR γ low expression	47 (57.3)	32 (39.0)	0.019
PPAR γ high expression	35 (42.7)	50 (61.0)	

Tabelle 18: Hohe PPAR γ Expression korreliert mit pulmonaler Metastasierung

Für die Gruppe der Lebermetastasen wurde auch ein Direktvergleich mit der M0 Gruppe durchgeführt. Es konnte im Gegensatz zu den Lungenmetastasen keine signifikante Korrelation (p=0.530) gezeigt werden (siehe Tabelle 19).

	M0	HEP	P-Wert
PPAR γ low expression	47 (57.3)	43 (52.4)	0.530
PPAR γ high expression	35 (42.7)	39 (47.6)	

Tabelle 19: Keine Korrelation zwischen PPAR γ Expression und Lebermetastasen

3.2.3 Korrelation der PPAR γ Expression und β -Catenin Expression und p53-Regulation

Darüber hinaus führten wir Korrelationsanalysen zwischen der PPAR γ Expression und weiteren Genen die eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des KRKs spielen durch. PPAR γ scheint an der Regulation des WNT-Signalwegs beteiligt zu sein [70]. Um mögliche Interaktionen zwischen der Expression von PPAR γ und dem WNT-Signalweg an unserem Studienkollektiv zu überprüfen, wurde diese mit der β -Catenin Expression korreliert, welche im Rahmen eines anderen Projekts an demselben Kollektiv bereits erhoben wurde. Unter Einschluss aller Patienten ergab sich eine hoch signifikante Korrelation (**p=0.001**) zwischen der PPAR γ Expression und der Expression von nukleärem β -Catenin. Insgesamt hatten 81 Patientenfälle sowohl eine niedrige Expression von PPAR γ als auch eine niedrige Expression

von β -Catenin. 56 Tumore zeigten eine starke Expression von PPAR γ , aber eine schwache Expression von β -Catenin. Weitere 41 Fälle exprimierten PPAR γ auf einem niedrigen Niveau, aber zeigten eine starke β -Catenin Expression. Der Rest der KRK (n=68) exprimierte sowohl PPAR γ als auch β -Catenin stark. Eine hohe Expression von PPAR γ war somit hoch signifikant mit einer hohen Expression von β -Catenin assoziiert und andersrum zeigte sich, dass eine niedrige Expression von PPAR γ mit einer niedrigen Expression von β -Catenin vergesellschaftet war (vergleiche Tabelle 20).

Gesamtkollektiv (n=246)			
	β-Catenin Expression low	β-Catenin Expression high	P-Wert
PPARγ Expression low	81 (66.4)	41 (33.6)	0.001
PPARγ Expression high	56 (45.2)	68 (54.8)	

Tabelle 20: Expression von PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin im Gesamtkollektiv

Im Anschluss wurden dieselben Korrelationsanalysen auch für einzelne Untergruppen untersucht. Unter Einschluss der M0-Gruppe (n=82) sowie der pulmonal metastasierten Gruppe (n=82) zeigte sich auch eine signifikante Korrelation ($p=0.017$) zwischen der Expression von PPAR γ und β -Catenin. Die einzelnen absoluten Zahlen sind in der Tabelle 21 dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass eine hohe bzw. niedrige Expression von PPAR γ mit einer hohen bzw. niedrigen Expression von β -Catenin assoziiert war.

M0 und PUL (n=164)			
	β-Catenin Expression low	β-Catenin Expression high	P-Wert
PPARγ Expression low	50 (63.3)	29 (36.7)	0.017
PPARγ Expression high	38 (44.7)	47 (55.3)	

Tabelle 21: PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin (M0 und PUL)

Unter Einschluss der M0-Gruppe und der hepatisch metastasierten Fälle konnte abermals eine signifikante Korrelation ($p=0.020$) zwischen den beiden Parametern gefunden werden. Die absoluten Fallzahlen für die jeweilige Art der Expression sind in der Tabelle 22 dargestellt.

M0 und HEP (n=164)			
	β-Catenin Expression low	β-Catenin Expression high	P-Wert
PPARγ Expression low	60 (66.7)	30 (33.3)	0.020
PPARγ Expression high	36 (48.6)	38 (51.4)	

Tabelle 22: PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin (M0 und HEP)

Zu guter Letzt wurde die Analyse noch für die hepatische Gruppe und die pulmonale Gruppe durchgeführt. In dieser Untergruppe zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation ($p=0.001$) zwischen der Expression von PPAR γ und β -Catenin. Die Verteilung der absoluten Zahlen ist

in Tabelle 23 dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass eine starke bzw. schwache Expression von PPAR γ mit einer starken bzw. schwachen Expression von β -Catenin vergesellschaftet war.

HEP und PUL (n=164)			
	β-Catenin Expression low	β-Catenin Expression high	P-Wert
PPARγ Expression low	52 (69.3)	23 (30.7)	0.001
PPARγ Expression high	38 (42.7)	51 (57.3)	

Tabelle 23: PPAR γ korreliert mit der Expression von nukleärem β -Catenin (HEP und PUL)

Zur Steigerung der Aussagekraft, dass die beiden Proteine sich gegenseitig beeinflussen, wurde eine weitere Korrelationsanalyse in einem frei verfügbaren Tumorkollektiv durchgeführt. Das Datenset wurde aus dem frei verfügbaren TCGA-Datensatz abgerufen und besteht aus 457 Fällen mit KRK. Es enthält Genexpressionsdaten (RNA Seq) von PPAR γ sowie von β -Catenin [123]. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ($r=0.196$) war mit einem p-Wert von **<0.001** hoch signifikant. Nicht nur für immunhistochemische Daten, sondern auch für die RNA-Expression konnte also gezeigt werden, dass eine hohe Expression von PPAR γ mit einer hohen β -Catenin Expression assoziiert war. (siehe Tabelle 24)

	β-Catenin Expression	P-Wert
PPARγ Expression	$r=0.196$	<0.001

Tabelle 24: Korrelation der Genexpressionsdaten von PPAR γ und β -Catenin im TCGA-Kollektiv

Das Tumorsuppressorgen p53 postuliert als der „molecular policeman“, der die Integrität des Genoms überwacht,[124] wurde im Folgenden mit der Expression von PPAR γ korreliert. Im Gesamtkollektiv zeigten 166 KRK ein dereguliertes p53, wobei 75 Tumore PPAR γ niedrig und 91 Tumore PPAR γ stark exprimierten. In 80 Tumoren war p53 reguliert, davon 47 mit schwacher und 33 mit hoher Expression von PPAR γ . Ein dereguliertes p53-Protein ging mit einer hohen Expression von PPAR γ einher, während Tumore mit reguliertem p53 eher eine niedrige Expression von PPAR γ zeigten. Diese Korrelation war statistisch signifikant (**p=0.046**).

Gesamtkollektiv (n=246)			
	P53 reguliert	P53 dereguliert	P-Wert
PPARγ Expression low	47 (38.5)	75 (61.5)	0.046
PPARγ Expression high	33 (26.6)	91 (73.4)	

Tabelle 25: P53-Deregulation ist mit einer hohen Expression von PPAR γ assoziiert

Im Anschluss wurde diese Analyse auch noch für die einzelnen Subgruppen durchgeführt. Für den Direktvergleich der Kontrollgruppe mit der pulmonalen Gruppe sowie der hepatischen Gruppe konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Die absoluten Zahlenwerte und der P-Wert sind der Vollständigkeit halber in Tabelle 26 dargestellt.

M0 & PUL (n=164)			
	P53 reguliert	P53 dereguliert	P-Wert
PPARγ Expression low	32 (40.5)	47 (59.5)	0.098
PPARγ Expression high	24 (28.2)	61 (71.8)	
M0 & HEP (n=164)			
	P53 reguliert	P53 dereguliert	P-Wert
PPARγ Expression low	32 (35.5)	58 (64.4)	0.243
PPARγ Expression high	20 (27.0)	54 (73.0)	

Tabelle 26: Keine Korrelation zwischen der p53 Regulation und der PPAR γ Expression in den Subgruppen

Der Vergleich der pulmonalen Gruppe mit der hepatischen Gruppe ergab eine signifikante Korrelation (**p=0.036**). 52 KRK waren p53 reguliert, wovon 30 Tumore eine niedrige und 22 eine hohe Expression von PPAR γ zeigten. Der Großteil der Tumore (n=112) war p53 dereguliert, davon hatten 45 Fälle eine schwache und 67 Fälle eine starke Expression von PPAR γ . Wie im Gesamtkollektiv war die p53 Deregulation mit einer starken PPAR γ Expression vergesellschaftet. Fälle mit reguliertem p53 zeigten häufiger eine niedrige Expression von PPAR γ (vergleiche Tabelle 27).

PUL & HEP (n=164)			
	P53 reguliert	P53 dereguliert	P-Wert
PPARγ Expression low	30 (40.0)	45 (60.0)	0.036
PPARγ Expression high	22 (24.7)	67 (75.3)	

Tabelle 27: P53-Deregulation ist mit einer hohen Expression von PPAR γ assoziiert (PUL und HEP)

3.2.4 PPAR γ Expression und Überleben

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Expression von PPAR γ einen Einfluss auf die Überlebensdauer von Patienten mit KRK hat. Um Verzerrungen aufgrund des Metastasierungsstatus zu vermeiden, wurde jede Kohorte isoliert betrachtet. Als Cut-Off für die Einteilung in „low“ bzw. „high“ Expression wurde der Median der jeweiligen Kohorte gewählt. Begonnen wurde mit der nicht-metastasierten Kohorte. Patienten mit einem niedrigen Expressionsstatus von PPAR γ hatten ein medianes OS von 153 Monaten. Patienten mit einer hohen Expression überlebten im Median 115 Monate. Als Referenzkategorie wurde für die COX-Regression „low expression“ festgelegt. Die Hazard von 2.04 zeigte, dass Patienten mit Tumoren, die PPAR γ hoch exprimierten, ein 2.04-faches Risiko für das Auftreten eines Ereignisses (=Tod) hatten. Eine niedrige Expression von PPAR γ war im M0-Kollektiv mit einer besseren Prognose assoziiert. Der Unterschied zwischen den Gruppen war mit einem p-Wert von **0.051** fast signifikant (siehe Tabelle 28). Zur graphischen Veranschaulichung wurde zusätzlich ein Kaplan-Meier-Schätzer bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass die Fälle mit einer niedrigen Expression eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten (vergleiche Abbildung 14). Der Log-Rank Test lieferte mit einem p-Wert von **0.045** ein signifikantes Ergebnis.

M0				
	PPARγ Expression low (median)	PPARγ Expression high (median)	Hazard Ratio	P-Wert
OS	153.0 [133.19; 172.81]	115.0 [92.8; 137.2]	2.04[0.997; 4.173]	0.051

Tabelle 28: Overall Survival der M0-Kohorte

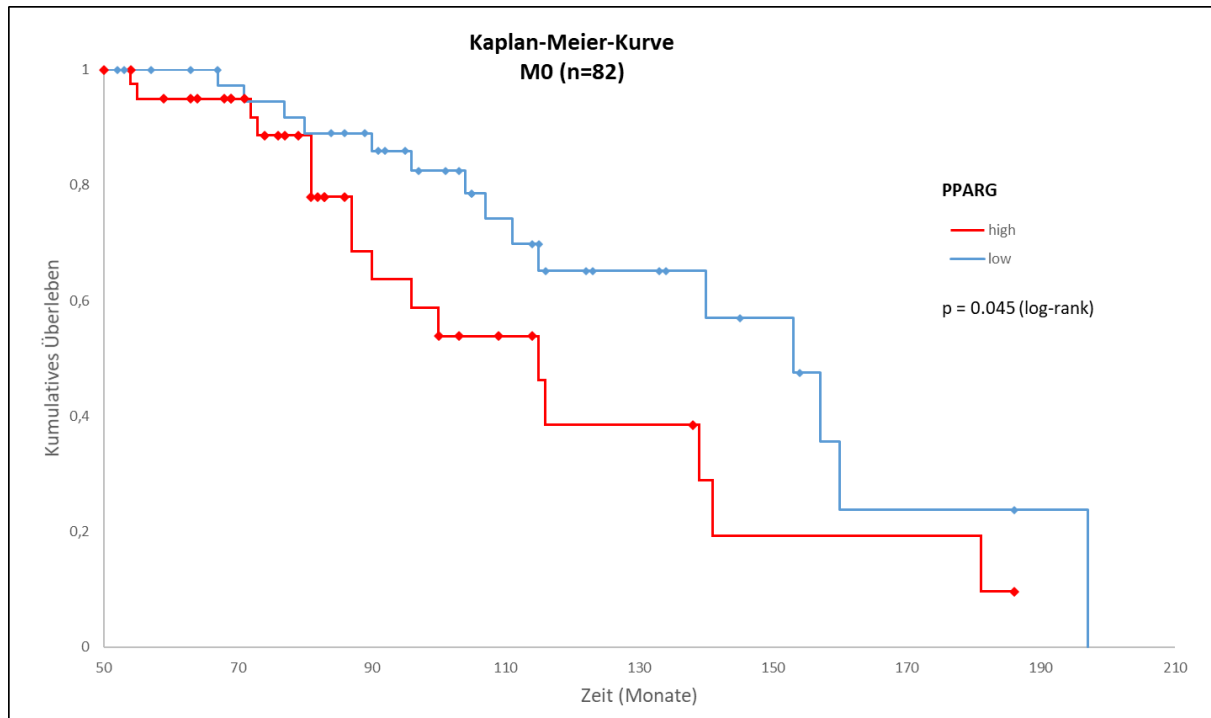


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Schätzer der M0-Kohorte

Auch für die pulmonale Gruppe wurde untersucht, ob die Expression von PPAR γ eine Aussage über das Überleben der Patienten zulässt. Die „low expression“ Gruppe hatte ein medianes OS von 59.97 Monaten, die „high expression“ Gruppe von 67.36 Monaten. Als Referenzkategorie gilt analog zur M0-Analyse „low expression“. Der Unterschied zwischen den Gruppen (HR: 0.578 [0.324; 1.03]) war allerdings nicht signifikant ($p=0.063$) (siehe Tabelle 29). Das gleiche Ergebnis lieferte auch der Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0.059 (vergleiche Abbildung 15).

PUL				
	PPAR γ Expression low (median)	PPAR γ Expression high (median)	Hazard Ratio	P-Wert
OS	59.97 [43.63; 76.3]	67.36 [63.07; 71.66]	0.578[0.324; 1.03]	0.063

Tabelle 29: Overall Survival der pulmonalen Kohorte

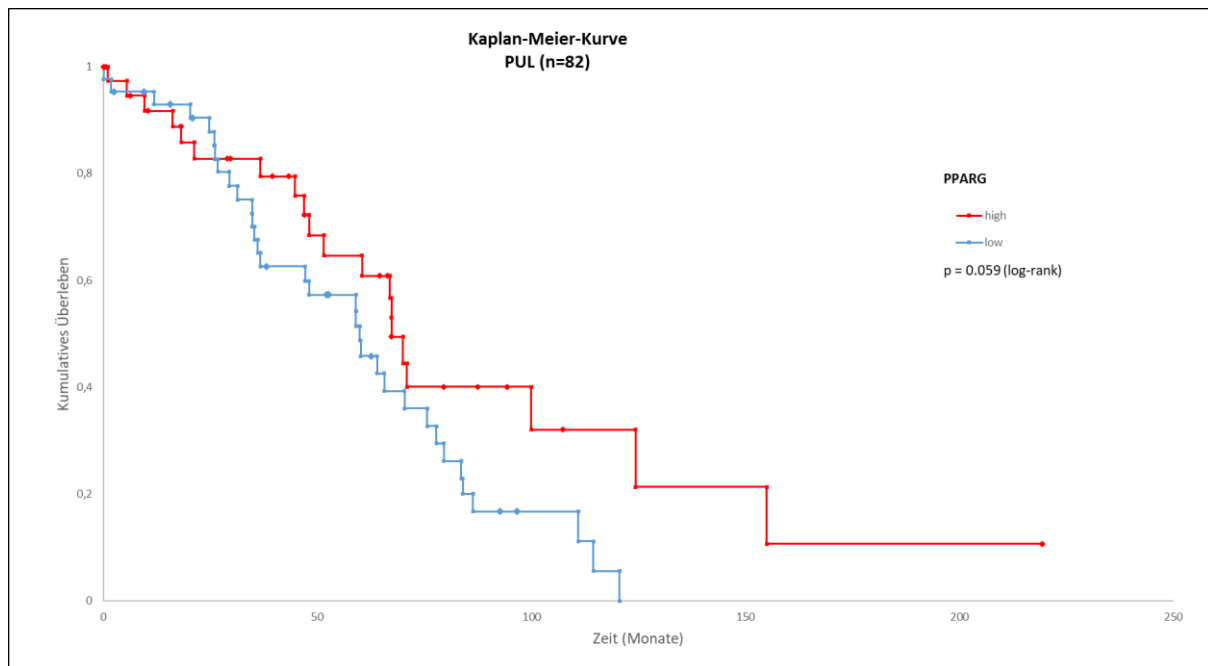


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Schätzer der pulmonalen Kohorte

In der hepatischen Kohorte hatte die „low expression“ Gruppe ein medianes OS von 35.24 Monaten, die „high expression“ Gruppe von 44.09 Monaten. Als Referenzkategorie gilt analog zur M0-Analyse „low expression“. Der Unterschied (HR: 0.838 [0.494; 1.421]) war nicht signifikant ($p=0.512$) (siehe Tabelle 30). Das gleiche Ergebnis lieferte auch der Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0.512 (vergleiche Abbildung 16)

HEP				
	PPAR γ Expression low (median)	PPAR γ Expression high (median)	Hazard Ratio	P-Wert
OS	35.24 [24.62; 45.87]	44.09 [24.51; 63.37]	0.838[0.494; 1.421]	0.512

Tabelle 30: Overall Survival der hepatischen Kohorte

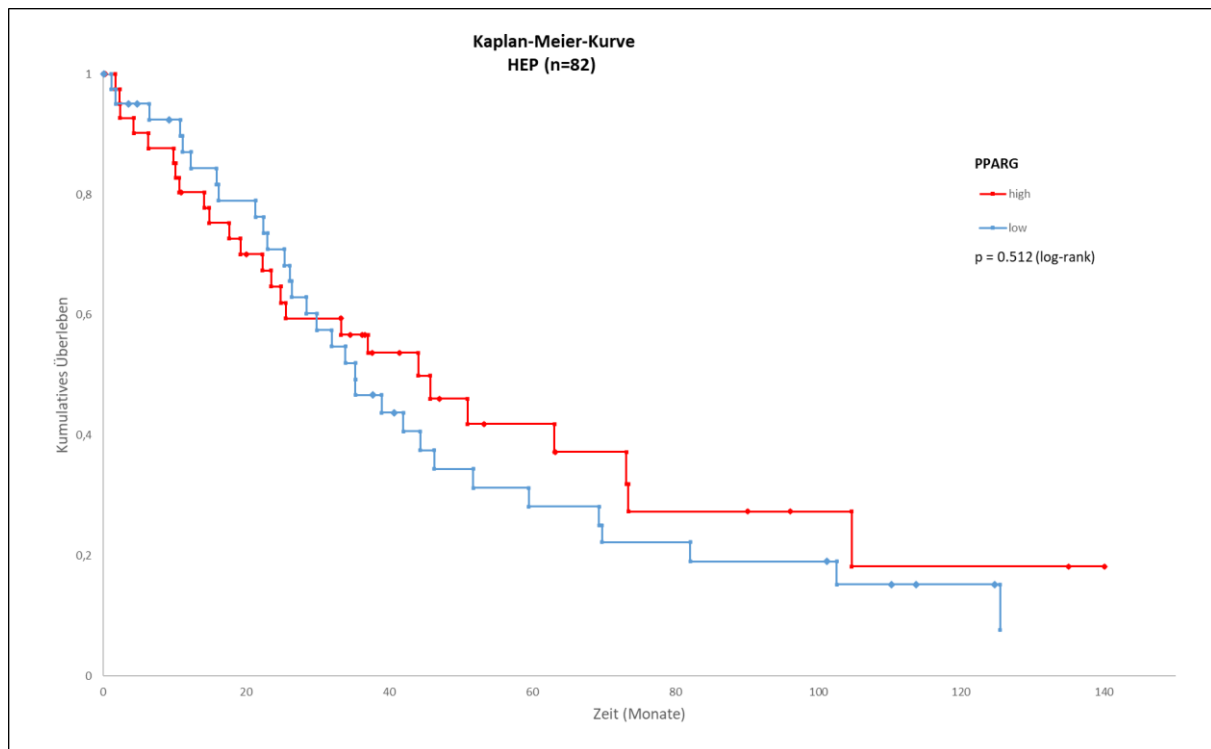


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Schätzer der hepatischen Kohorte

Darüber hinaus führten wir, zusätzlich zu den Überlebensuntersuchungen an unserem Kollektiv, eine Analyse an dem frei zugängliche Tumorkollektiv von Sheffer et al.[125] in Bezug auf die PPAR γ Expression und das Überleben durch. Hierfür wurden zunächst die Genexpressionsdaten (RNA Seq) von 178 Primärtumoren mit den zugehörigen klinischen Daten korreliert. Analog zu unserem Kollektiv erfolgte die Einteilung in die Gruppen „low“ und „high expression“ von PPAR γ anhand des Medians. Es zeigte sich ein signifikant besseres Überleben in der Gruppe der niedrig exprimierenden Tumore (**p=0.015**) (vergleiche Abbildung 17). Mit einer HR von 1.82 [1.11;2.98] lebten Patienten der „low expression“ Gruppe fast doppelt so lange wie Patienten der Gruppe mit „high expression“ Tumoren.

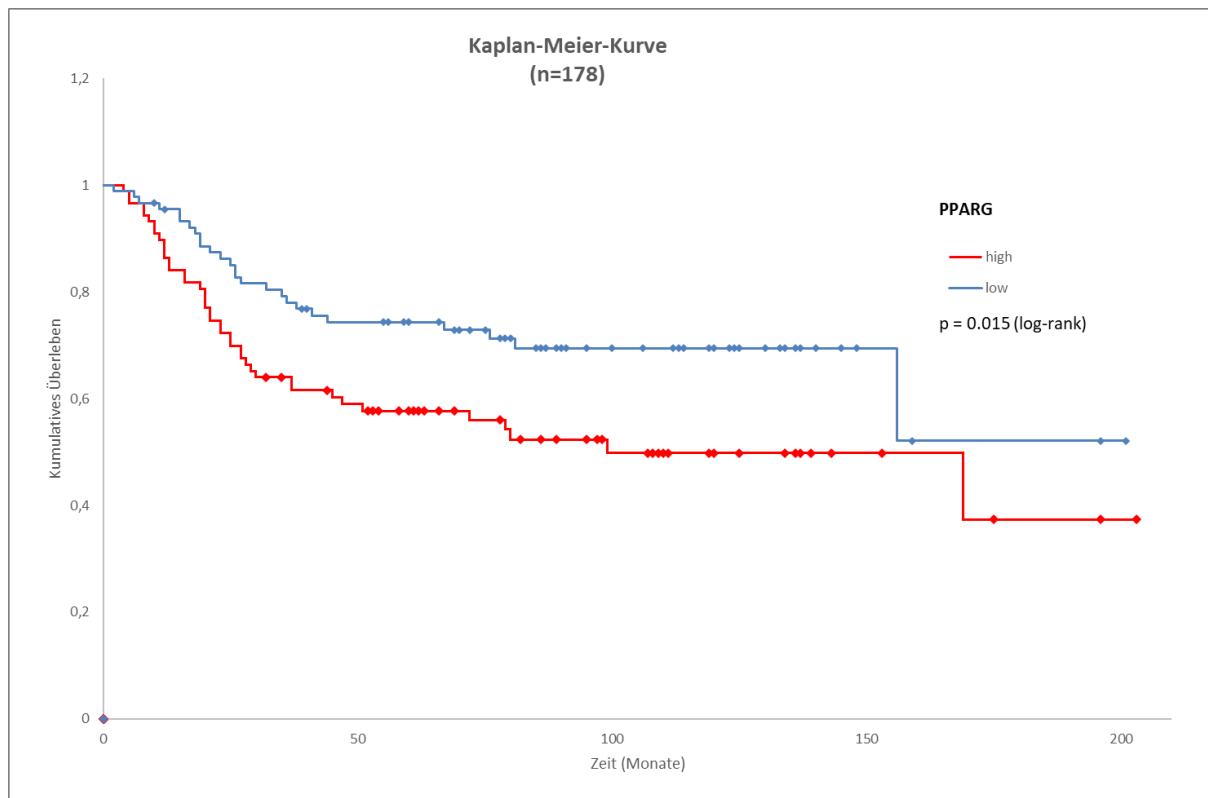


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Schätzer des Sheffer et al. Kollektivs[125]

3.3 Zellkulturexperimente

3.3.1 Vortestungsergebnisse zur Etablierung der experimentellen Bedingungen

Nach Abschluss der immunhistochemischen und klinischen Analysen erfolgte die Charakterisierung der PPAR γ -Funktion im KRK durch die Durchführung von Zellkulturexperimenten. Um das bestmögliche Versuchsmodell zu etablieren, wurden zunächst zahlreiche Zelllinien des KRKs auf das Expressionsniveau von PPAR γ getestet. Im Rahmen der Zellkulturexperimente sollte ein transienter Knockdown mittels siPool durchgeführt werden. Hierfür eignen sich Zelllinien mit einer hohen Genexpression, um später aussagekräftige Vergleiche bezogen auf das Expressionsniveau von PPAR γ ziehen zu können. Für die Zelllinien SW403 sowie HT29 zeigte sich sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene (Abbildung 18 und Abbildung 19) eine starke Expression, sodass die Wahl für die Zellkulturexperimente auf diese Zelllinien fiel.

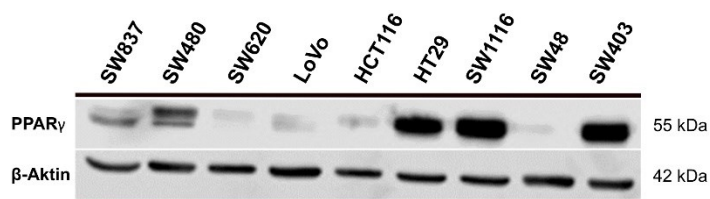


Abbildung 18: PPAR γ -Expression in kolorektalen Zelllinien

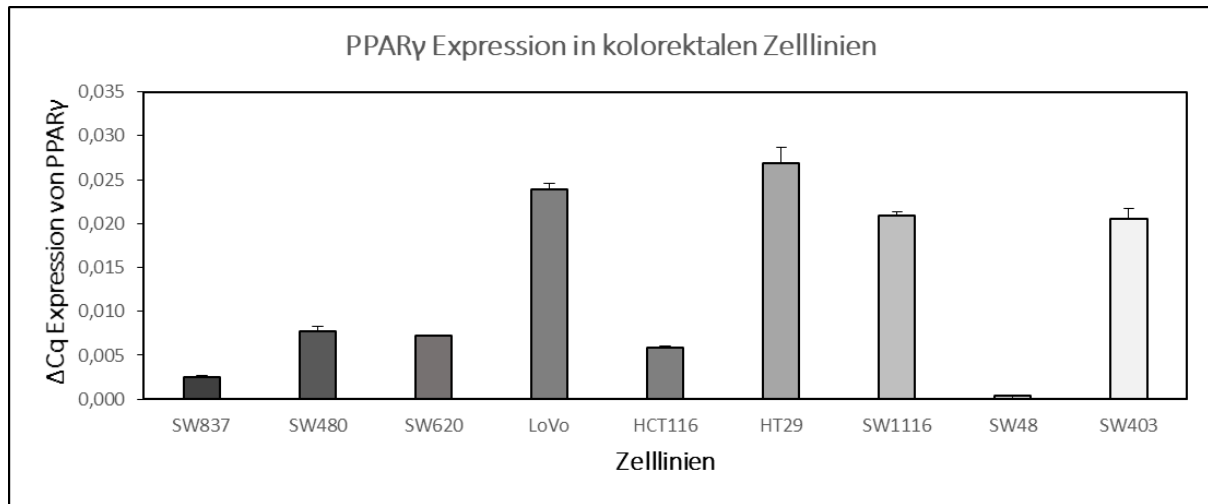


Abbildung 19: Expressionsniveau von PPARγ auf RNA-Ebene in Zelllinien des KRRs

Im nächsten Schritt wurde in den Zelllinien der transiente Knockdown, wie unter Punkt 2.3.5.1 erläutert, etabliert. Abbildung 20 zeigt die Funktionalität der Transfektion bei 2 und 5 nm nach 24 und 48 Stunden, sodass bei höherer Spezifität bei niedrigeren Konzentrationen mit einer finalen Konzentration von 2 nm gearbeitet wurde.

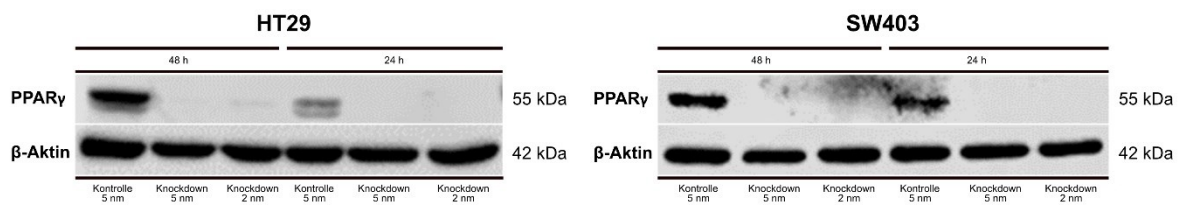


Abbildung 20: Transienter KD von PPARγ in den Zelllinien SW403 und HT29

Darüber hinaus wurde, wie unter Punkt 2.3.5.2 beschrieben, zum Nachweis der direkten Aktivierung von PPARγ durch die Agonisten Pio- bzw. Rosiglitazon das PPARγ nachgeschaltete Zielgen CK20 untersucht. Abbildung 21 zeigt, dass die Aktivierung von PPARγ durch die Gabe von Pio- bzw. Rosiglitazon 20 μM zu einer Erhöhung des Expressionsniveaus von CK20, verglichen mit der DMSO-Behandlung, führte. In Zellen mit einem Knockdown von PPARγ wurde die Expression von CK20 nicht durch die Gabe von Agonisten beeinflusst. Das Expressionsniveau war verglichen mit der DMSO-Kontrolle im Knockdown reduziert. Die PPARγ Agonisten waren somit PPARγ-abhängig an der Regulation von Zielgenen von PPARγ beteiligt.

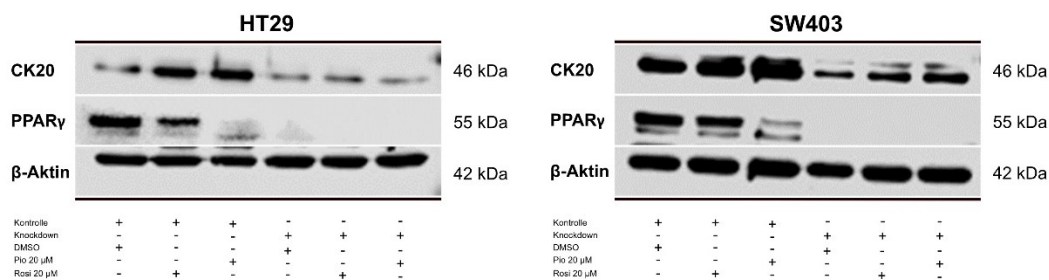


Abbildung 21: CK20 Expression nach Behandlung mit PPARγ-Agonisten

3.3.2 Proliferation-Zellviabilitäts-Assays

3.3.2.1 Knockdown von PPAR γ führt zur Reduktion der Zellviabilität in SW403

Als erster wichtiger Punkt sollte die Funktion von PPAR γ auf die Zellviabilität bzw. die Proliferation untersucht werden, da die Zunahme der Zellproliferation eine der wichtigsten biologischen Fähigkeiten während der mehrstufigen Entwicklung von Tumoren darstellt [126]. Mittels der Durchführung eines transienten KD in den Zelllinien HT29 und SW403 sollte überprüft werden, welchen Effekt PPAR γ auf die Zellviabilität in kolorektalen Zelllinien hat. In der Zelllinie SW403 führte der KD von PPAR γ zu einer höchst signifikanten ($p < 0.0001$) Reduktion der Zellviabilität. Verglichen mit der Kontrolle betrug der Lebendzellanteil in der KD-Gruppe nur 81 % (siehe Abbildung 22, Bild B). In der Zelllinie HT29 zeigte sich allerdings kein signifikanter ($p = 0.54$) Unterschied zwischen der KD- und Kontrollgruppe (siehe Abbildung 22, Bild A). Alle Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt [127].

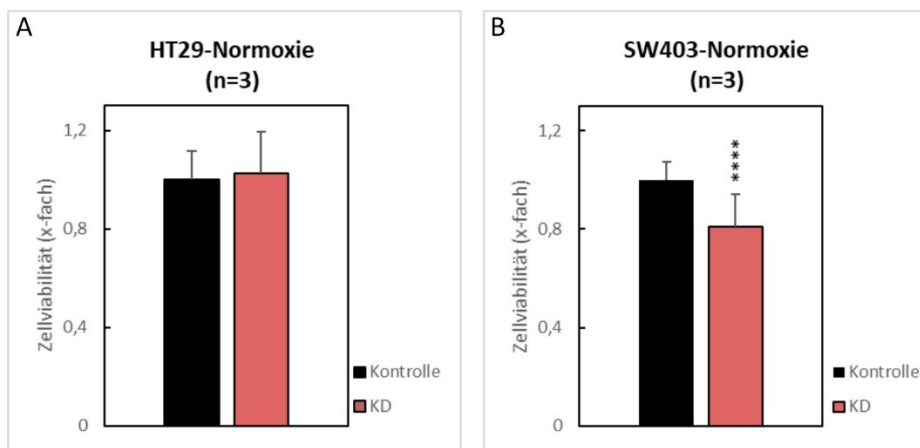


Abbildung 22: PPAR γ Knockdown reduziert die Proliferationsrate in SW403

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt zeitabhängig ist, wurde nachfolgend eine Wachstumskurve über den Zeitraum von 72 Stunden angefertigt. In Abbildung 23 sind exemplarische Resultate eines Versuches der jeweiligen Zelllinie (gesamt $n=3$) dargestellt. Für die HT29 konnte, im Einklang stehend mit den vorherigen Ergebnissen, kein Unterschied zwischen den KD- bzw. Kontrollzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum gemessen werden ($p > 0.05$ für 24 h, 48 h und 72 h). In den SW403 hingegen konnte bereits nach 24 Stunden ein signifikanter ($p = 0.04$), wenn auch geringer Effekt gesehen werden. Der PPAR γ -KD führte zu einer signifikanten Reduktion des Lebendzellanteils in den SW403. Dieser Effekt verstärkte sich deutlich nach 48 und 72 Stunden und war zu beiden Zeitpunkten hoch signifikant ($p < 0.001$ bzw. $p < 0.0001$).

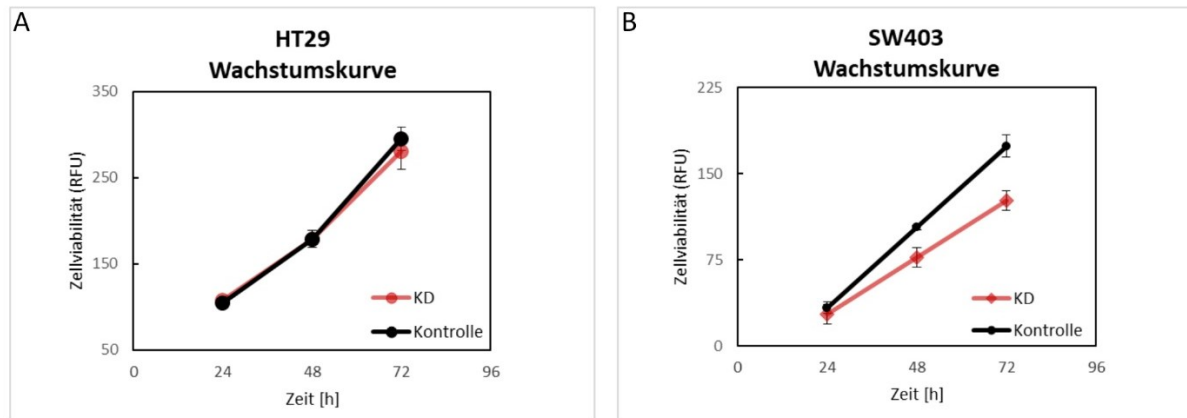


Abbildung 23: Wachstumskurve der Zellen SW403 und HT29 mit PPAR γ Knockdown

3.3.2.2 PPAR γ Inhibitor GW9662 senkt die Proliferationsrate in KRK-Zellen

Um den zuvor beobachteten Effekt des PPAR γ -KDs auf die Proliferationsrate noch genauer zu beleuchten, wurden die Zelllinien mit einem selektiven PPAR γ Inhibitor GW9662 behandelt. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen in den Zelllinien ausgetestet, um eine geeignete Zielkonzentration zu definieren. Es zeigte sich bereits in dem einmaligen Versuch eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität (vergleiche Abbildung 24). Auf Basis dieser Resultate wurde in allen nachfolgenden Experimenten der Inhibitor GW9662 mit einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

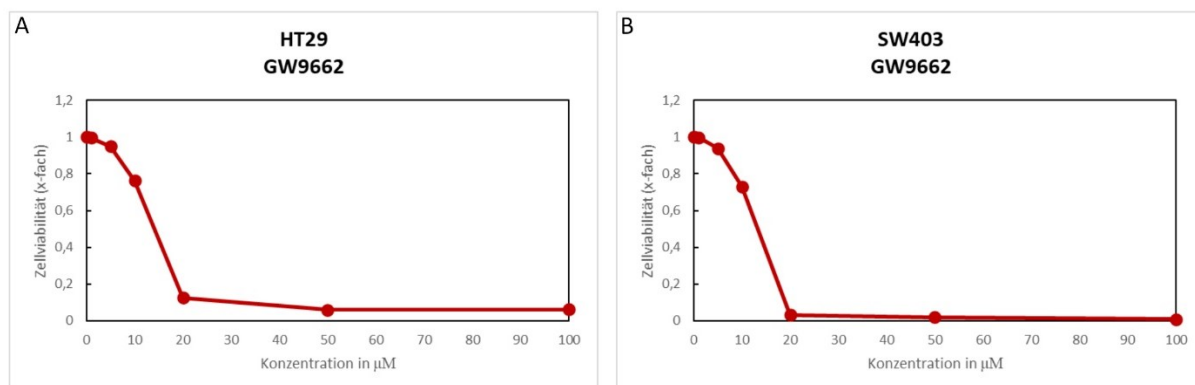


Abbildung 24: Austestung der GW9662 Konzentration

Im nächsten Schritt wurde das eigentliche Experiment in biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Inhibition durch GW9662 führte analog dem Knockdown zu einer Reduktion der Zellviabilität in den Zelllinien HT29 und SW403. 96 Stunden nach Inhibitorgabe betrug der Lebendzellanteil der HT29, verglichen mit der DMSO behandelten Gruppe, nur noch 51 % (vergleiche Abbildung 25, Bild A). Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von **p < 0.0001** höchst signifikant. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in SW403 beobachtet werden. Hier führte die Inhibition zu einer Absenkung der Proliferation auf 64 % verglichen mit der DMSO-Behandlung (siehe Abbildung 25, Bild B). Auch dieser Unterschied war mit einem p-Wert von **p < 0.0001** höchst signifikant. Alle Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt [127].

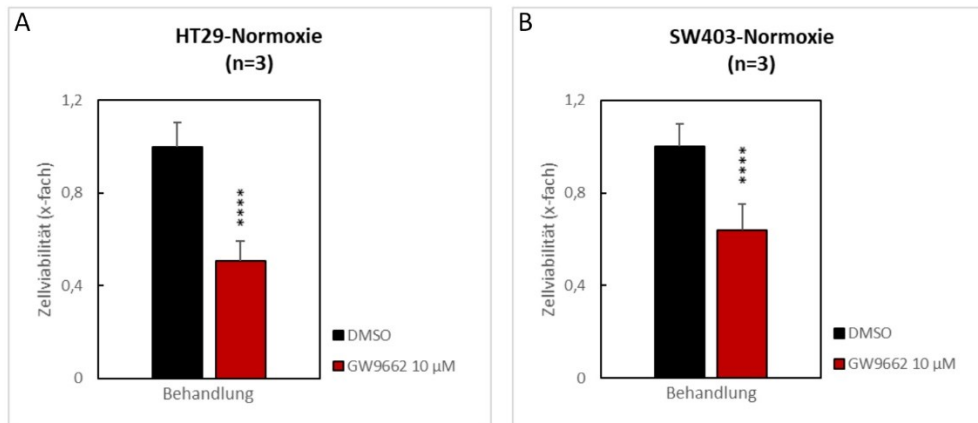


Abbildung 25: PPAR γ Inhibitor GW9662 reduziert die Proliferation in kolorektalen Zelllinien

3.3.2.3 PPAR γ Agonisten steigern die Proliferation in KRK-Zellen

Um nun zu testen, ob die Aktivierung von PPAR γ zu gegenteiligen Effekten führt, wurden die Zelllinien HT29 und SW403 mit den PPAR γ Agonisten Pioglitazon und Rosiglitazon behandelt. Die zur Festlegung der Arbeitskonzentration pipettierten Wachstumskurven zeigten sowohl für die HT29 als auch für die SW403 eine dosisabhängige Steigerung der Proliferationsrate (siehe Abbildung 26). Diese einmalige Austestung der Konzentrationen diente als Grundlage für die weiteren Proliferationsexperimente. In nachfolgenden Versuchen wurden die Zellen mit 20 µM bzw. 80 µM Pio-/Rosiglitazon behandelt.

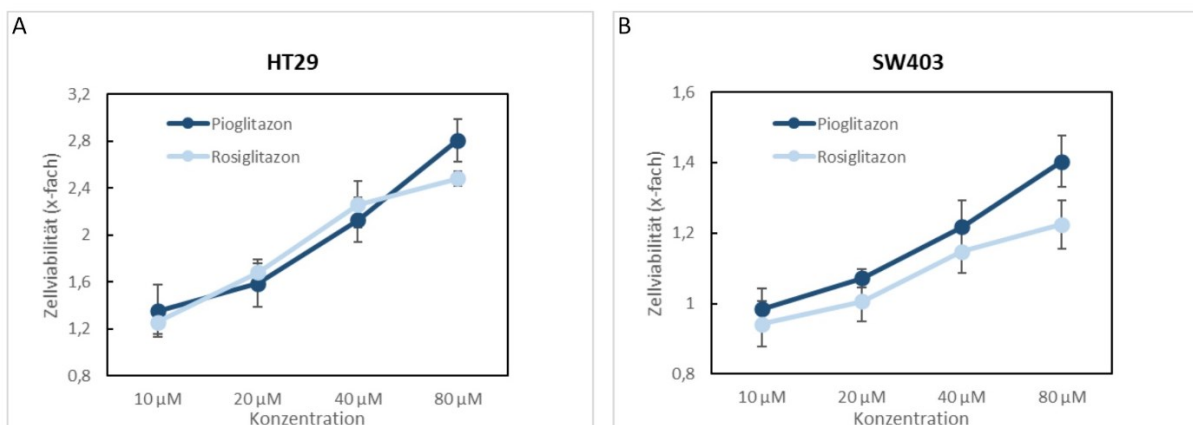


Abbildung 26: Austestung der Agonisten Konzentration

Alle Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Hier zeigte sich, dass Pioglitazon und Rosiglitazon die Zellviabilität von kolorektalen Zelllinien signifikant steigerten. Für die Zelllinie HT29 konnte der Lebendzellanteil um das 1.9-fache für die Gabe von Pioglitazon 20 µM bzw. um das 1.5-fache für die Gabe von Rosiglitazon 20 µM erhöht werden (siehe Abbildung 27, Bild A). Eine Erhöhung der Agonistenkonzentration auf 80 µM führte zu einem weiteren Anstieg der Proliferationsrate. So steigerte sich die Zellviabilität verglichen mit der DMSO Gruppe für die Gabe von Pioglitazon auf das 2.4-fache und für die Gabe von Rosiglitazon auf das 2.2-fache (vergleiche Abbildung 27, Bild B). Diese

Unterschiede waren alle mit einem p-Wert von $p < 0.0001$ höchst signifikant. Für die SW403 konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Die Gabe von Pioglitazon 20 μM steigerte höchst signifikant die Proliferation um 12 % verglichen mit der DMSO Gruppe ($p < 0.0001$). Rosiglitazon 20 μM senkte entgegen den Erwartungen die Proliferation um 7 % ($p < 0.01$) (siehe Abbildung 27, Bild C). In höheren Konzentrationen konnte allerdings sowohl für Pio- als auch für Rosiglitazon eine Steigerung der Zellviabilität beobachtet werden. Pioglitazon 80 μM erhöhte den Lebendzellanteil um das 1.9-fache, Rosiglitazon 80 μM auf das 1.5-fache (vergleiche Abbildung 27, Bild D). Diese Unterschiede waren, verglichen mit der DMSO-Behandlung und einem p-Wert von $p < 0.0001$, höchst signifikant.

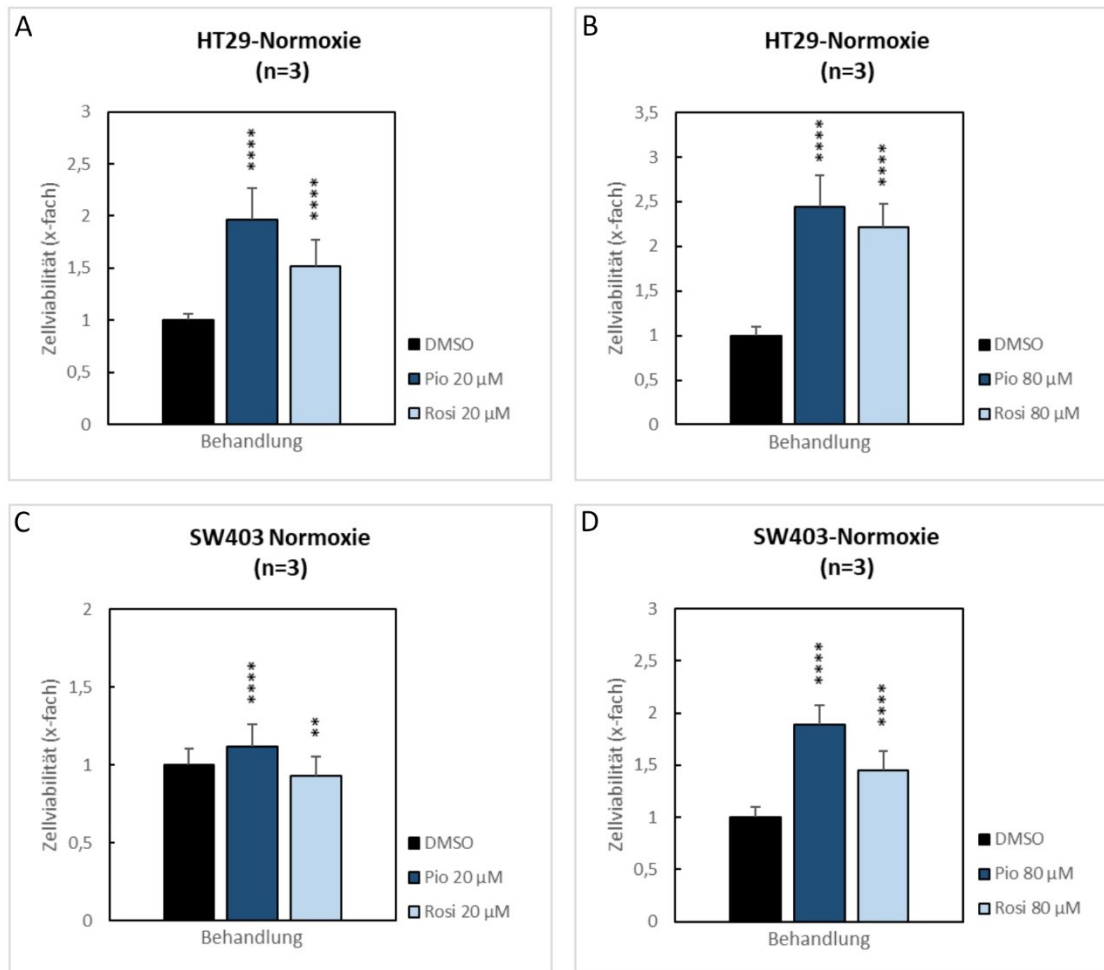
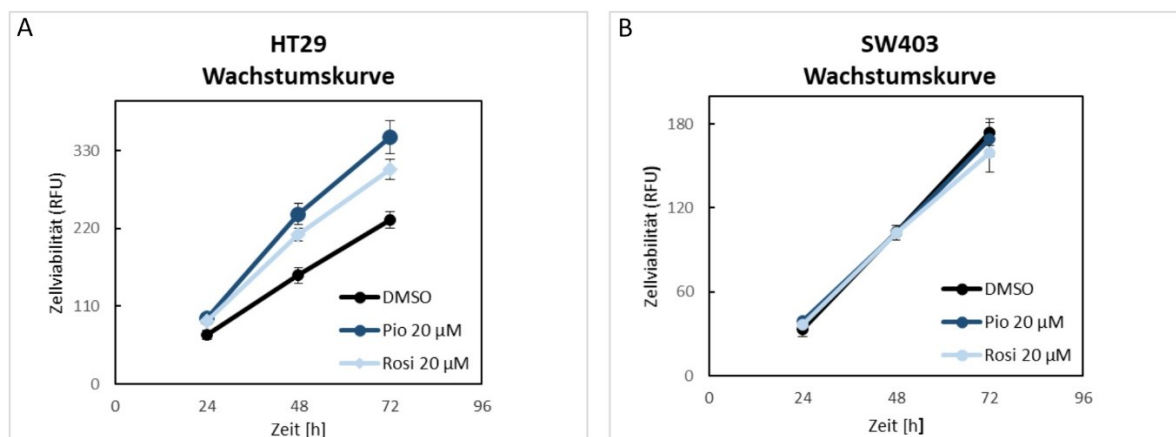


Abbildung 27: PPAR γ Agonisten fördern die Proliferation in kolorektalen Zelllinien

Auch für die Behandlung mit PPAR γ Agonisten wurden zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit des beobachteten Effektes Wachstumskurven erstellt. Abbildung 28 zeigt einen beispielhaften Versuch für die HT29 (Bild A) bzw. SW403 (Bild B). In den HT29 konnte bereits nach 24 Stunden eine signifikante Steigerung der Zellviabilität sowohl für die Behandlung mit Rosi- als auch Pioglitazon 20 μM beobachtet werden. Dieser Effekt verstärkt sich für die Zeitpunkte 48 und 72 Stunden und war hoch signifikant. Alle Signifikanzwerte sind zur besseren Übersicht für die einzelnen Gruppen und Zeitpunkte in Tabelle 31 dargestellt. Für die SW403 hingegen konnte für den Zeitpunkt nach 72 Stunden und die Behandlung mit Rosiglitazon 20 μM eine signifikante Reduktion des Lebendzellanteils beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den oben beschriebenen Resultaten.

Abbildung 28: Wachstumskurve PPAR γ Agonisten

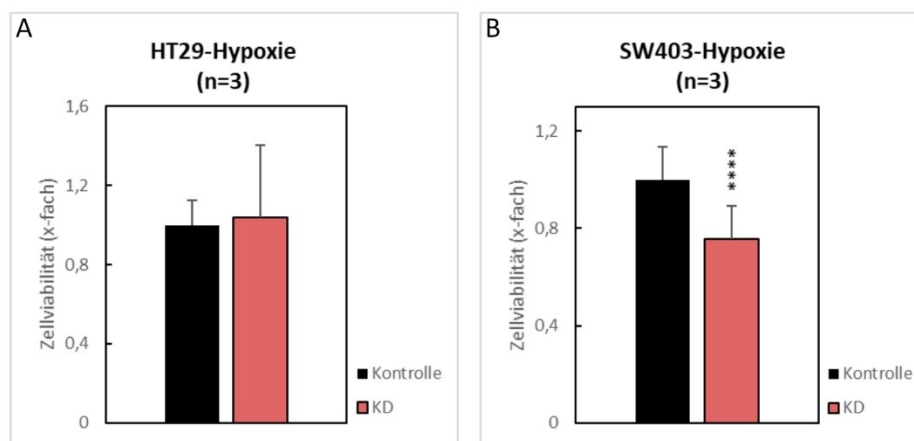
		Treatment	24h	48h	72h
HT29	DMSO gegen	Rosi 20 μ M	0.01	<0.0001	<0.001
		Pio 20 μ M	0.01	<0.001	<0.001
SW403	DMSO gegen	Rosi 20 μ M	0.21	0.45	0.03
		Pio 20 μ M	0.1	0.75	0.49

Tabelle 31: Signifikanzwerte der Wachstumskurven

Zusammenfassend konnte die Inhibition sowie auch der KD von PPAR γ die Zellviabilität reduzieren. PPAR γ Agonisten führten in höheren Konzentrationen zu einer Steigerung der Proliferation von kolorektalen Zelllinien [127].

3.3.3 Einfluss von Hypoxie auf die PPAR γ Funktion

Da in der Literatur der Einfluss von Hypoxie auf die PPAR γ -Funktion zahlreich diskutiert wird [128-131], wurden die Experimente analog zu den eben erwähnten Ergebnissen unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Für die HT29 konnte auch unter hypoxischen Bedingungen kein Einfluss des PPAR γ Knockdowns auf die Zellviabilität beobachtet werden ($p=0.58$). In den SW403 bestätigte sich das Ergebnis aus den Normoxie Experimenten. Der Lebendzellanteil sank in der KD-Gruppe höchst signifikant auf 76 % ab ($p < 0.0001$) (siehe Abbildung 29).

Abbildung 29: Knockdown von PPAR γ unter hypoxischen Bedingungen

Auch die Behandlung mit dem Inhibitor GW9662 lieferte annähernd vergleichbare Ergebnisse wie unter Normoxie. In den HT29 führte die PPAR γ Inhibition mit GW9662 10 μ M zu einem Absinken der Zellviabilität auf 39 % und in den SW403 auf 63 % (siehe Abbildung 30). Diese Unterschiede waren, verglichen mit der DMSO-Behandlung, höchst signifikant ($p < 0.0001$).

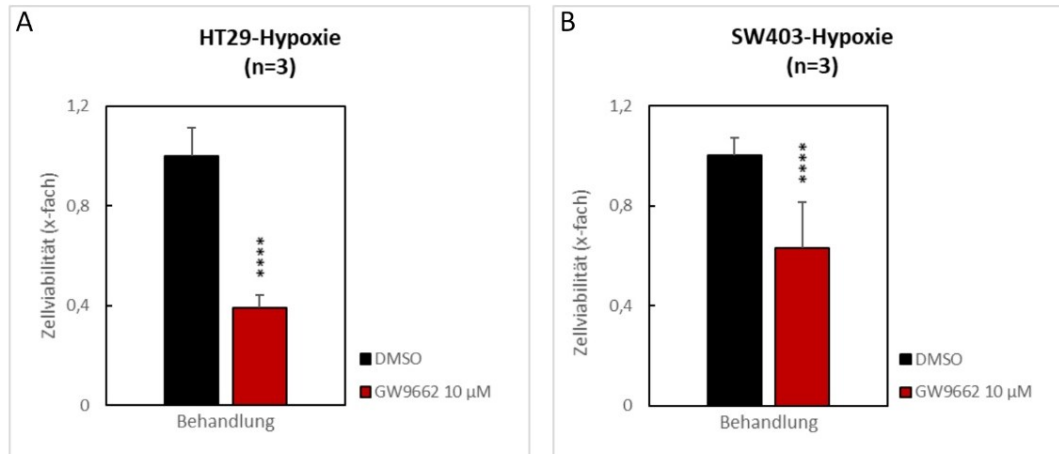


Abbildung 30: Behandlung mit dem PPAR γ Inhibitor GW9662 unter hypoxischen Bedingungen

Zu guter Letzt haben wir auch noch die Behandlung mit PPAR γ Agonisten unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Auch hier zeigten sich keine relevanten Unterschiede verglichen mit den Ergebnissen aus der Normoxie. In den HT29 führten sowohl Pio- als auch Rosiglitazon 20 μ M bzw. 80 μ M zu einer höchst signifikanten Steigerung ($p < 0.0001$) der Proliferationsrate. In den SW403 konnte, wie schon unter Normoxie, eine hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität ($p < 0.001$) für die Behandlung mit Rosiglitazon 20 μ M beobachtet werden. Die Dosissteigerung auf 80 μ M erzielte sowohl für Pio- als auch für Rosiglitazon erneut eine höchst signifikante Steigerung ($p < 0.0001$) des Lebendzellanteils.

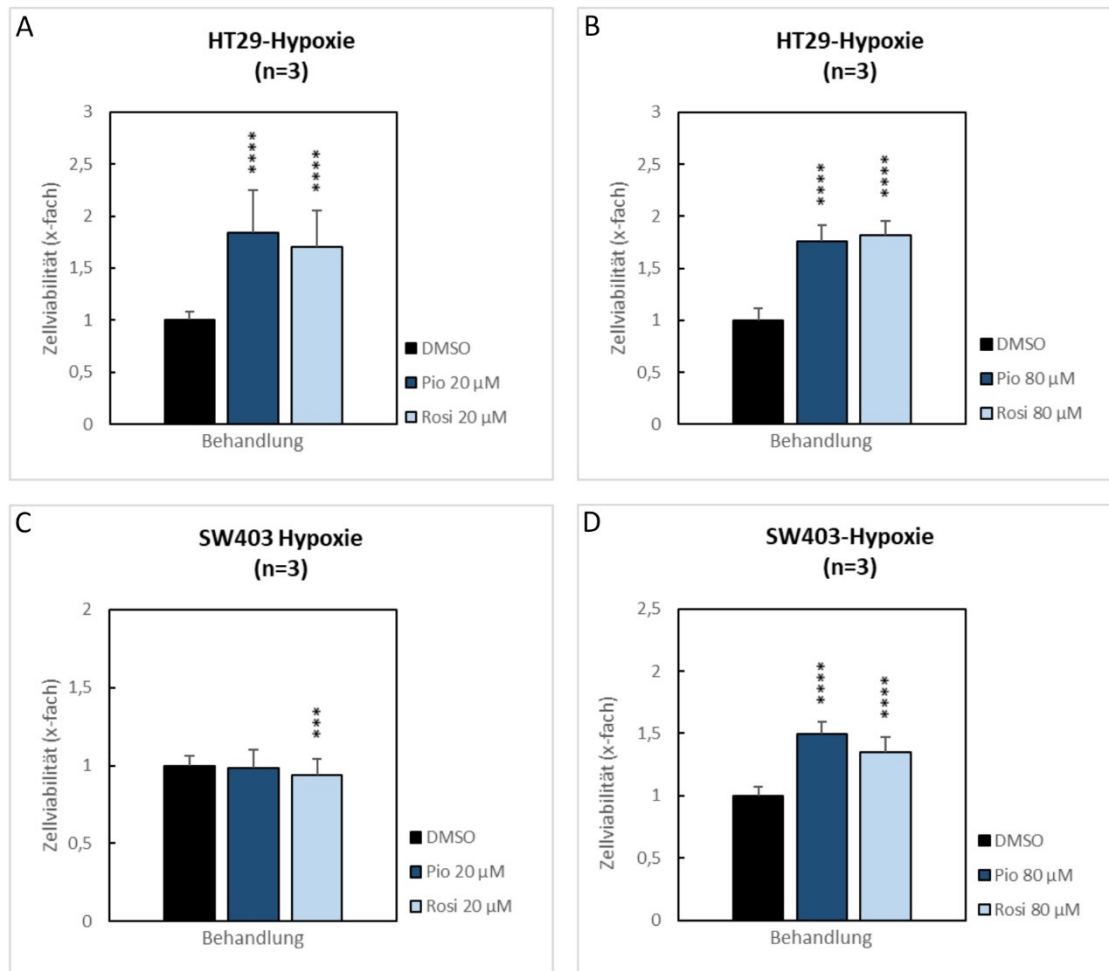


Abbildung 31: Behandlung mit PPAR γ Agonisten unter hypoxischen Bedingungen

3.3.4 Funktion von PPAR γ unter Elesclomol induzierter ROS-Produktion

3.3.4.1 PPAR γ schützt KRC-Zelllinien vor reaktiven Sauerstoffspezies

Neben der Beurteilung der Zellviabilität unter hypoxischen Bedingungen sollte auch der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die verschiedenen Behandlungsgruppen und die Proliferation untersucht werden. Für die Induktion von ROS wurde Elesclomol in verschiedenen Konzentrationen (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) eingesetzt. In der Zelllinie HT29 konnte zwischen dem Knockdown und der Kontrolle kein Unterschied beobachtet werden (vergleiche Abbildung 32, Bild A-C). In den SW403 hingegen führte der PPAR γ -Knockdown unter allen Elesclomol-Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität verglichen mit der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 32, Bild D-F). PPAR γ wirkt hier somit protektiv vor ROS.

Generell gilt für alle gezeigten Box-Plots unter Punkt 3.3.4.1, dass sie die Zellviabilität normalisiert auf die jeweilige Behandlungsgruppe ohne Elesclomolbehandlung darstellen. Beispielhaft sei hier das Bild D der Abbildung 32 genauer erläutert. Für die Behandlung mit 0,1 μ M Elesclomol sinkt die Zellviabilität der Zelllinie SW403 in der Knockdowngruppe auf 40,2 % (Median) gegenüber der Behandlung mit 0 μ M Elesclomol, in der Kontrollgruppe hingegen nur auf 63,4 % (Median).

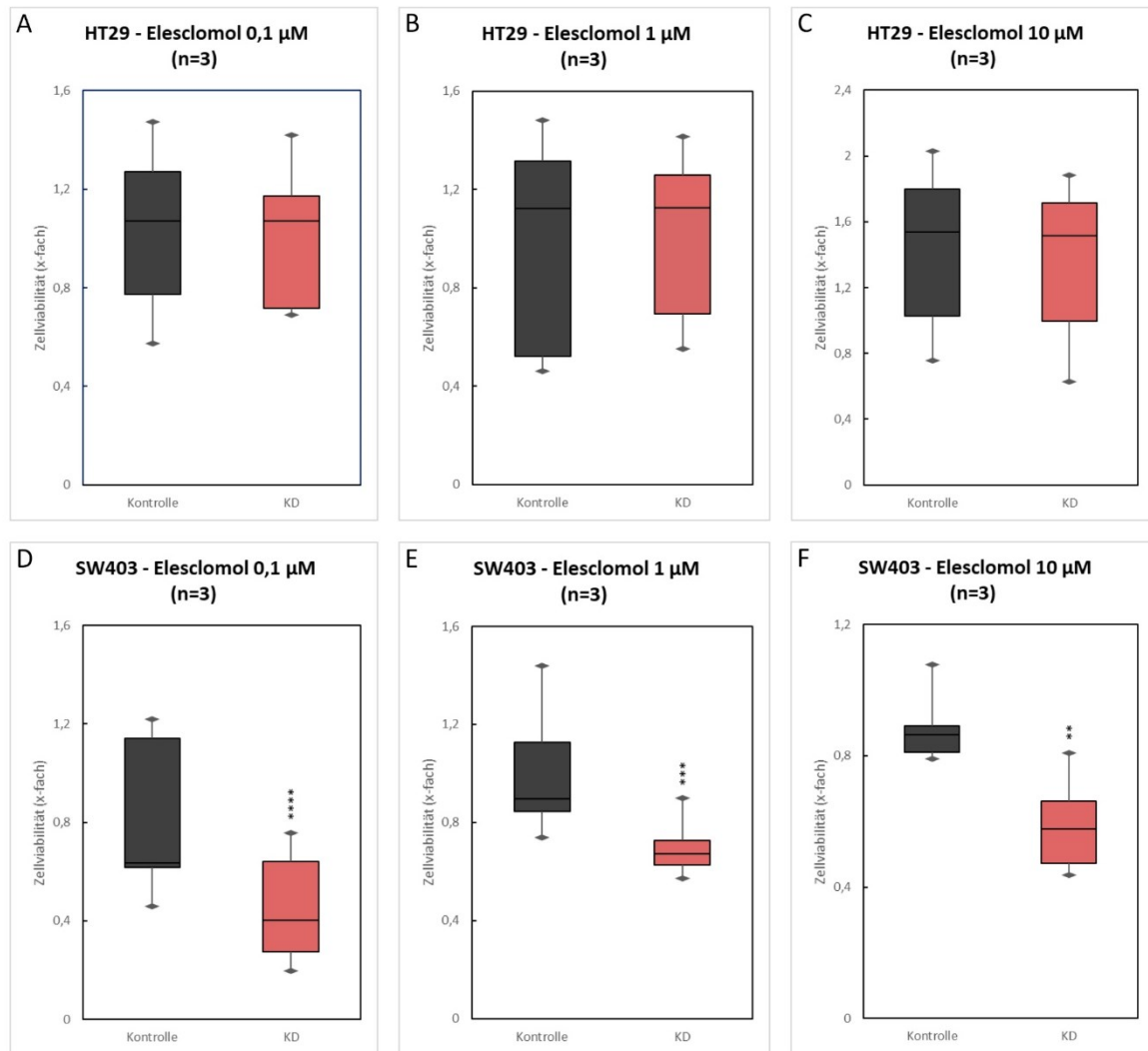


Abbildung 32: PPAR γ schützt die Zelllinie SW403 vor ROS

Um den Effekt in der Zelllinie SW403 noch weiter zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Inhibitor GW9662 10 µM vorbehandelt. Hier konnte sowohl für die Zelllinie HT29 als auch für die Zelllinie SW403 eine signifikante Reduktion der Zellviabilität durch die Behandlung mit dem PPAR γ Inhibitor, verglichen mit der DMSO-Gruppe, beobachtet werden. Diese Wirkungsbeziehung zwischen dem PPAR γ -Inhibitor und der Zellviabilität zeigte sich für alle untersuchten Elesclomol-Konzentrationen (vergleiche Abbildung 33). Die Inhibition von PPAR γ führt somit zu einem sensitiveren reagieren auf ROS in kolorektalen Zelllinien und deckt sich mit den Ergebnissen aus dem Knockdown in der Zelllinie SW403.

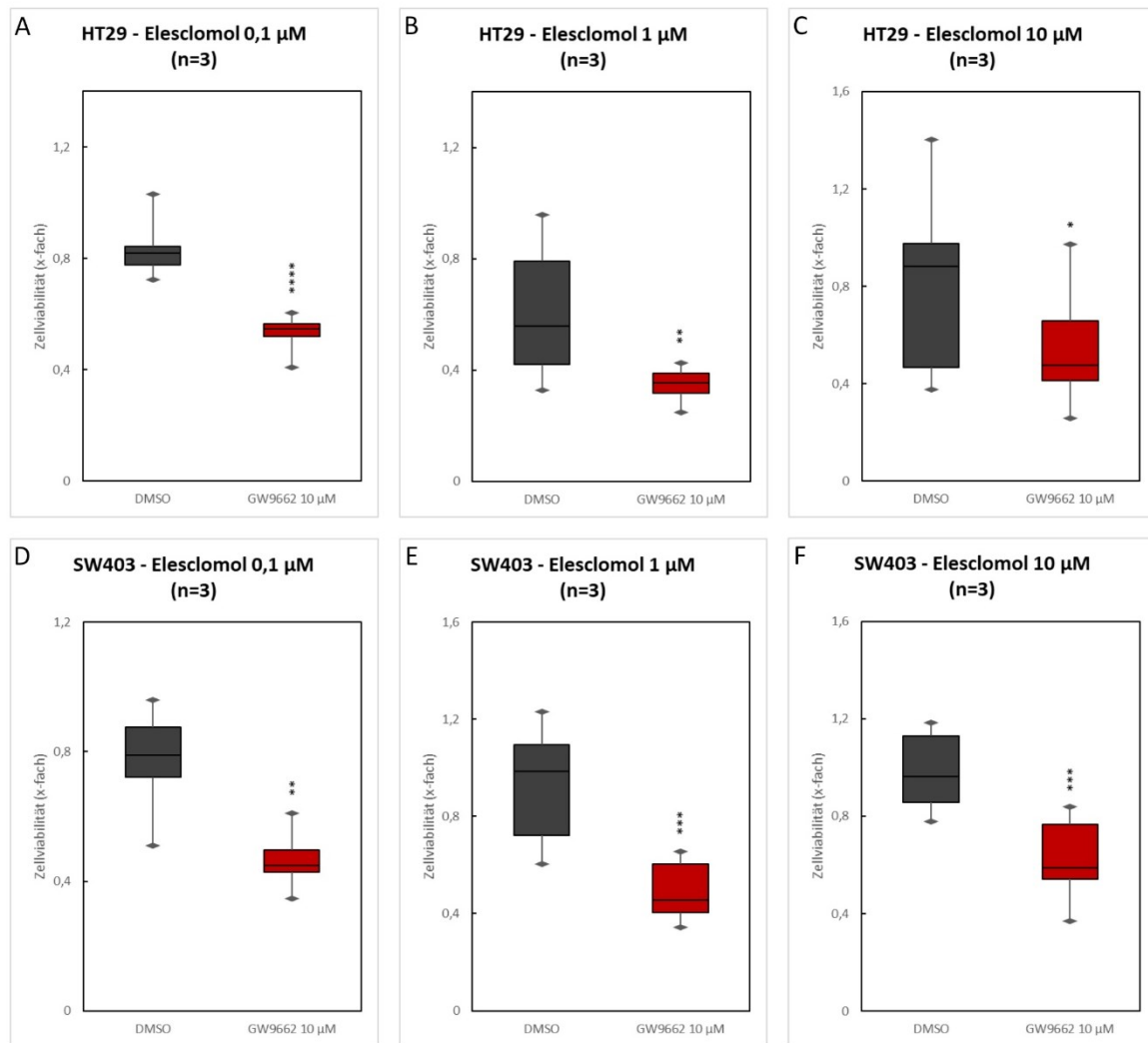


Abbildung 33: Die Inhibition von $PPAR\gamma$ erhöht die Sensitivität auf ROS

Im nächsten Schritt sollte dann überprüft werden, ob die Aktivierung von $PPAR\gamma$ zu einem gesteigerten Überleben der Zellen unter der Induktion von ROS durch Elesclomol führt. Dazu wurden die Zellen mit Pio- bzw. Rosiglitazon 20 µM und 80 µM vorbehandelt. In der Zelllinie HT29 führte, wider unserer Erwartung, die Behandlung tendenziell auch zu einer Reduktion der Zellviabilität. So konnte für die Konzentration mit 20 µM Pio- bzw. Rosiglitazon für alle Elesclomolkonzentrationen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden. Eine Ausnahme stellte die Behandlung mit Rosiglitazon bei einer Elesclomolkonzentration von 0,1 µM dar. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Für die höhere Agonistenkonzentration (80 µM) konnte nur für die Behandlung mit Rosiglitazon und einer Elesclomolkonzentration von 0,1 µM eine geringfügige Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden. Alle Ergebnisse sind in der Abbildung 34 als Box-Plot veranschaulicht. Bild A bis C zeigen die Ergebnisse für die niedrigere (20 µM) Agonistenkonzentration, Bild D bis F für die höhere (80 µM) Konzentration.

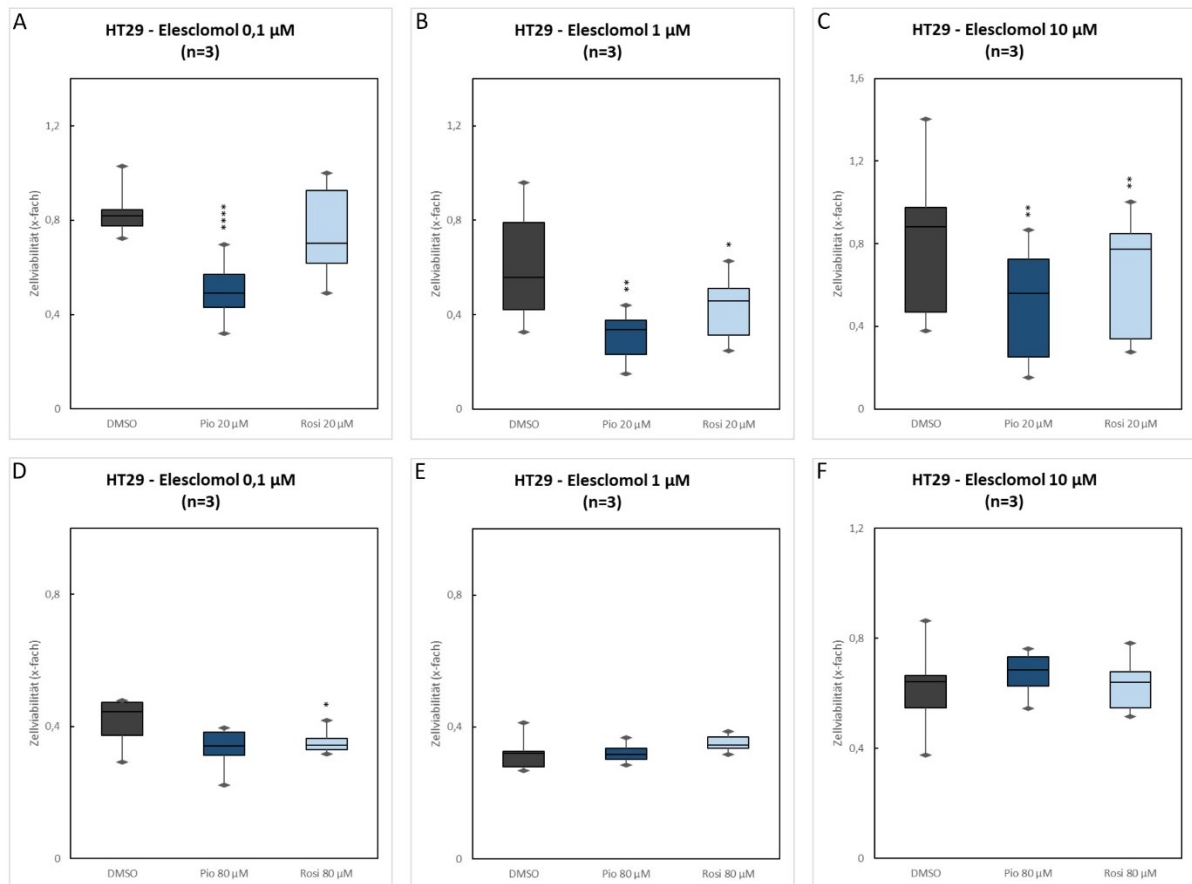


Abbildung 34: Wirkung von PPAR γ -Agonisten unter Elesclomol Behandlung in HT29

Auch in der Zelllinie SW403 wurde der Einfluss der PPAR γ -Aktivierung durch die Agonisten Pio- bzw. Rosiglitazon auf die Zellviabilität unter Elesclomol induzierter ROS-Produktion untersucht. Hier zeigten sich sowohl für die niedrigere (vergleiche Abbildung 35, Bild A-C), als auch für die höhere (siehe Abbildung 35, Bild D-F) Agonistenkonzentration keine Unterschiede. Nur für die Behandlung mit Rosiglitazon 80 µM und einer Elesclomolkonzentration von 1 µM wurde ein signifikantes Absinken der Zellviabilität beobachtet.

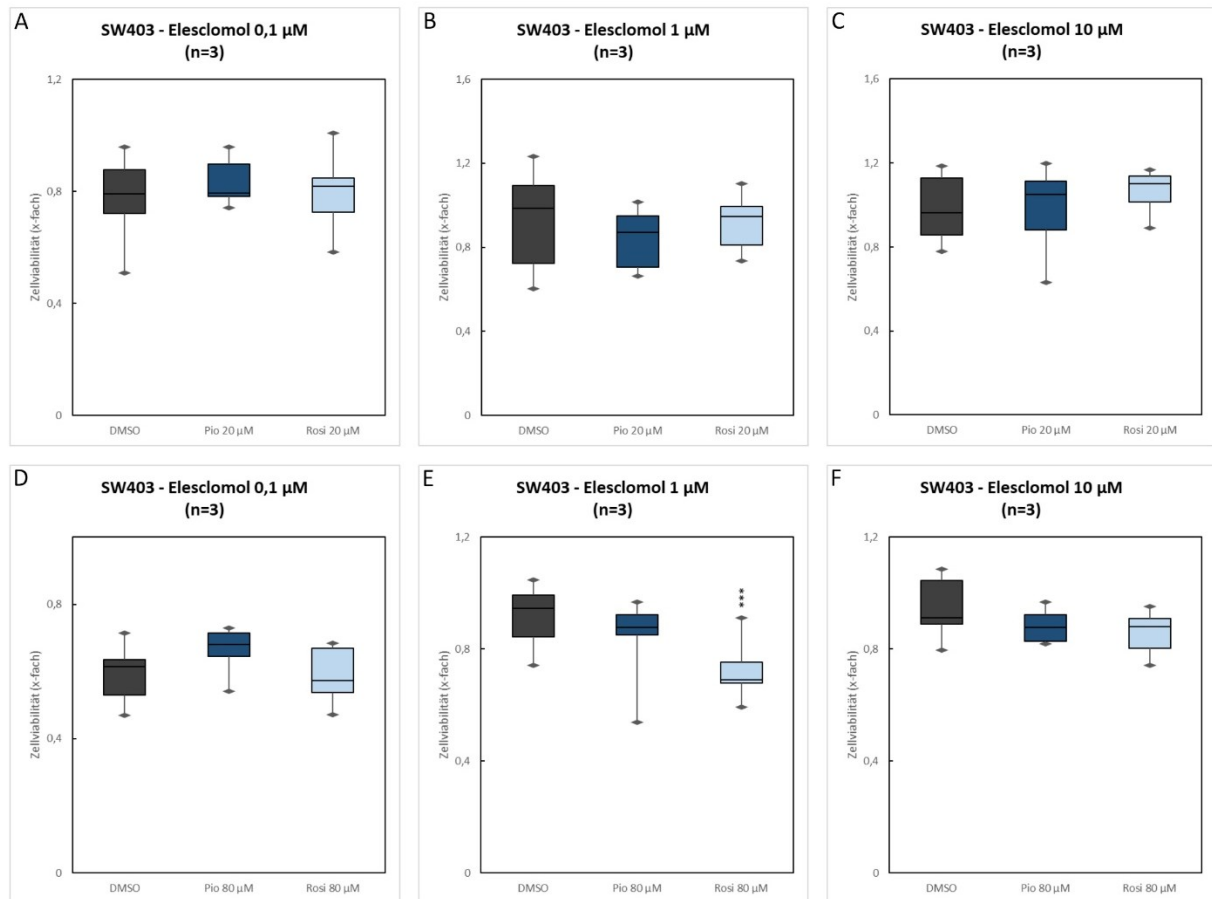


Abbildung 35: Wirkung von PPAR γ -Agonisten unter Elesclomol Behandlung in SW403

In Tabelle 32 sind die exakten P-Werte aller Elesclomol-Assays zusammengefasst. Sie beziehen sich immer auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Behandlung	Elesclomol	p-Werte (HT29)	p-Werte (SW403)
KD	0,1 μM	0.93	< 0.0001
	1 μM	0.67	< 0.001
	10 μM	0.52	< 0.01
GW9662 10 μM	0.1 μM	< 0.0001	< 0.01
	1 μM	< 0.01	< 0.001
	10 μM	0.04	< 0.001
Pio 20 μM	0.1 μM	< 0.0001	0.17
	1 μM	< 0.01	0.17
	10 μM	< 0.01	0.95
Rosi 20 μM	0.1 μM	0.15	0.26
	1 μM	0.02	0.9
	10 μM	< 0.01	0.1
Pio 80 μM	0.1 μM	0.07	0.13
	1 μM	0.85	0.35
	10 μM	0.42	0.11
Rosi 80 μM	0.1 μM	0.02	0.68
	1 μM	0.19	< 0.001
	10 μM	0.85	0.16

Tabelle 32: P-Werte der Elesclomol-Assays

3.3.4.2 Expression wichtiger Gene des oxidativen Stresses

Um mögliche Erklärungen für die entdeckten protektiven Effekte von PPAR γ vor ROS zu finden, wurde die Expression wichtiger Gene des oxidativen Stresses untersucht. SOD1, GPX1 und CAT stellen Antioxidantien dar. UCP2 ist bekannt dafür, die mitochondriale ROS-Produktion zu hemmen [122]. Die Veränderungen der Expressionsniveaus der untersuchten Gene nach Behandlung mit Pio- bzw. Rosiglitazon und dem Inhibitor GW9662 sind in Abbildung 36 dargestellt. Für SOD1 konnte in der Zelllinie HT29 eine signifikante Steigerung der Expression nach Behandlung mit Rosiglitazon beobachtet werden. In der Zelllinie SW403 hingegen führte Pioglitazon zu einem signifikanten Absinken der SOD1 Expression nach Pioglitazongabe. Auch führte die Inhibition von PPAR γ zu einer Steigerung der SOD1 Expression. Für das Antioxidans GPX1 zeigte sich in beiden Zelllinien eine niedrigere Expression nach Agonisten- und Inhibitorgabe verglichen mit der DMSO-Behandlung. Die CAT Expression hingegen konnte nach Agonistenbehandlung in beiden Zelllinien signifikant gesteigert werden. Allerdings führte in der Zelllinie SW403 auch die Inhibition von PPAR γ zu einer geringfügig erhöhten CAT Expression. Die UCP2 Expression konnte nur in der Zelllinie HT29 beurteilt werden, da in den Zelllinien SW403 die Expression (Detektion nach Zyklus 35) zu gering war. In den HT29 wurde für die Behandlung mit Pio- bzw. Rosiglitazon eine gesteigerte Expression beobachtet. Die Inhibition führte wiederum zu einer signifikanten Reduktion der UCP2 Expression.

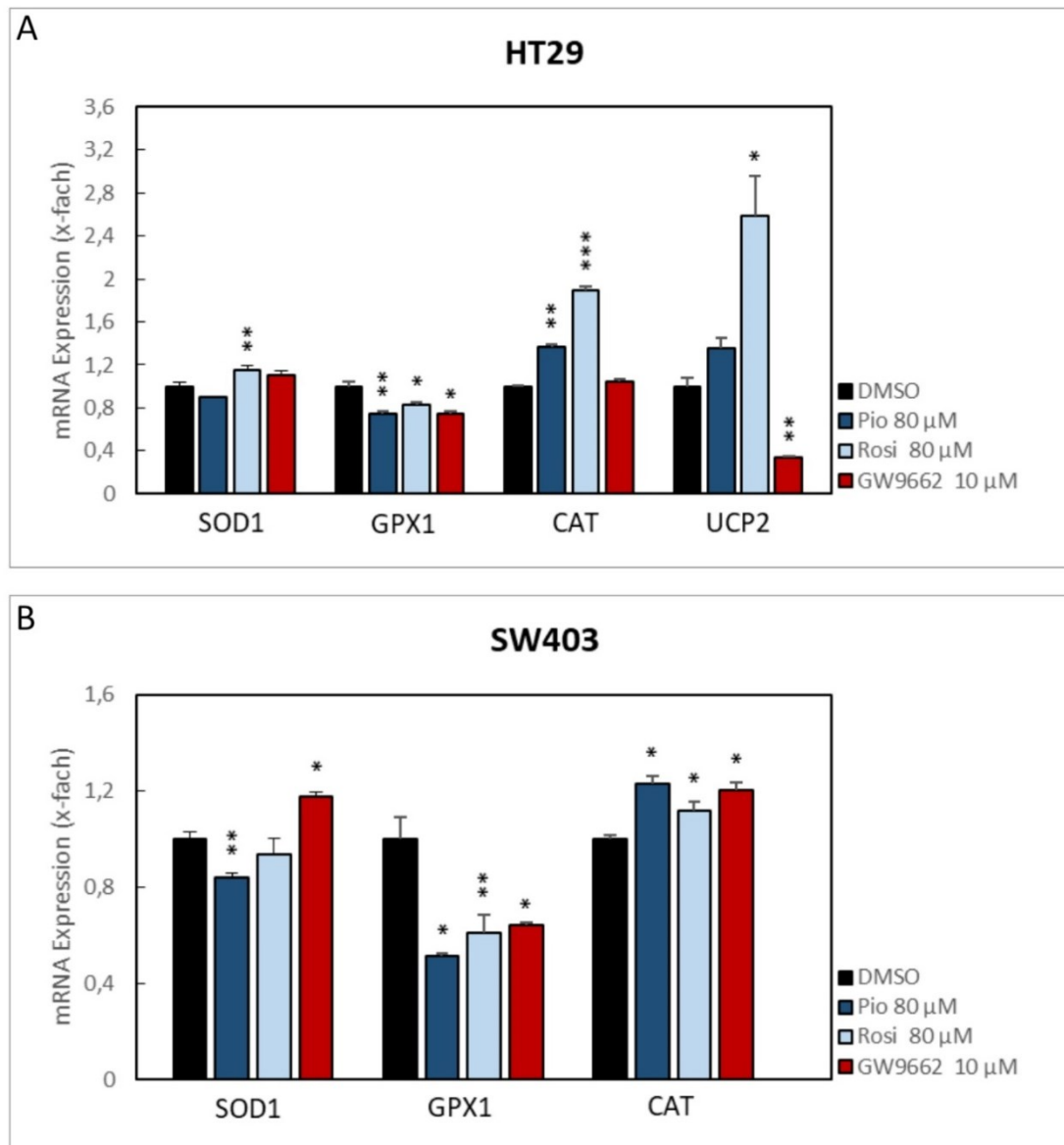


Abbildung 36: Expression wichtiger Gene des oxidativen Stresses

3.3.5 PPAR γ Agonisten erhöhen die 5-FU Chemotherapiesensitivität

Im nächsten Schritt sollte, nachdem wir gesehen haben (siehe Punkt 3.3.2.1; 3.3.2.2; 3.3.2.3), dass PPAR γ Agonisten bzw. Inhibitoren unter anderem die Proliferation von kolorektalen Zelllinien beeinflussen, untersucht werden, welchen Einfluss die verschiedenen Behandlungsgruppen auf die Chemotherapiesensitivität von 5-FU haben. In den Dosis-Wirkungskurven (vergleiche Abbildung 37) zeigte sich, dass die Behandlung mit PPAR γ Agonisten in den Zelllinien HT29 und SW403 zu einer signifikanten Steigerung der Chemotherapiesensitivität führt. Die IC₅₀ lag in der Zelllinien HT29 für die Vorbehandlung mit Pio- bzw. Rosiglitazon (80 µM) bei 4.4 µM bzw. 5.3 µM. In der Kontrollgruppe war mit 31.4 µM eine deutlich höhere 5-FU Konzentration notwendig um die Hälfte der maximal möglichen Hemmung (=IC₅₀) zu erreichen. Diese Unterschiede sind mit einem p-Wert von $p < 0.0001$ höchst signifikant. Vergleichbare Ergebnisse konnten wir auch in der Zelllinie

SW403 beobachten. Hier lag die IC₅₀ für die Vorbehandlung mit Pioglitazon bei 3.8 μM und für Rosiglitazon bei 5.0 μM . Die IC₅₀ für die Zellen ohne Vorbehandlung war mit 10.6 μM deutlich höher. Die Unterschiede waren hoch signifikant ($p < 0.0001$ bzw. $p < 0.001$). Auch in den SW403 zeigte sich somit eine Steigerung der Sensitivität auf das Chemotherapeutikum 5-FU. Im Einklang dazu führte die Vorbehandlung mit dem PPAR γ Inhibitor zu resistenteren Zellen, bezogen auf die Behandlung mit 5-FU. In den HT29 lag die IC₅₀ für die GW9662-behandelten Zellen bei 100.5 μM , in den SW403 bei 18.8 μM . Allerdings war dieser Unterschied nur für die Zelllinien HT29 mit einem p-Wert von $p=0.03$ signifikant. In den SW403 konnte keine Signifikanz erreicht werden.

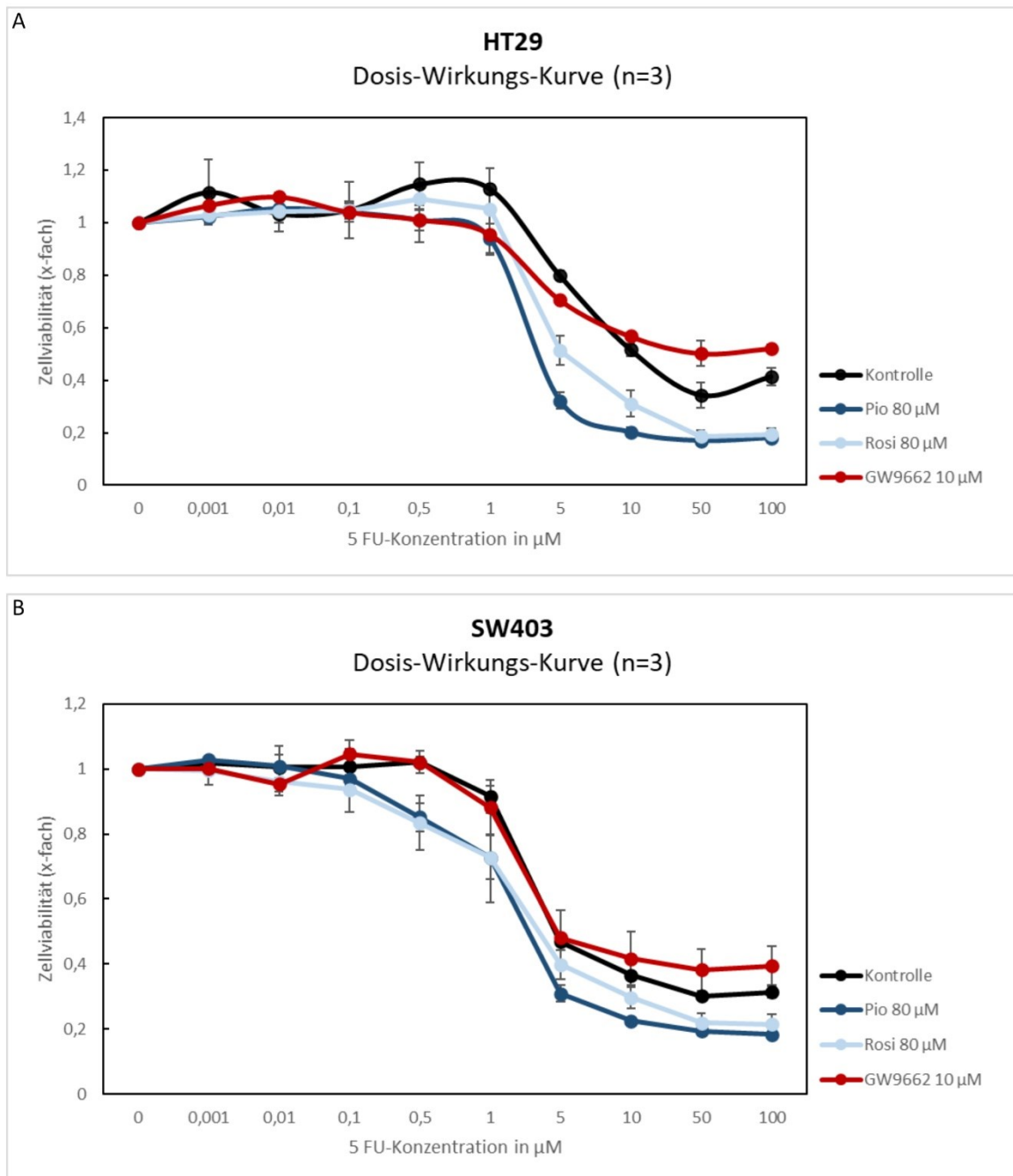


Abbildung 37: Dosis-Wirkungs-Kurve des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil

In Tabelle 33 sind die IC₅₀, die Änderungsrate der IC₅₀ sowie die p-Werte aller Behandlungsgruppen zusammengefasst. Die Änderungsrate der IC₅₀ bezieht sich auf die IC₅₀ der Kontrollgruppe. Die p-Werte vergleichen immer die jeweilige Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe.

	Behandlungsgruppe	IC₅₀ (μM) Mittelwert±SD	Änderungsrate der IC₅₀ Mittelwert±SD	p-Wert
HT29	Kontrolle	31.4 ± 8.2		
	Pio 80 μM	4.4 ± 0.8	0.14 ± 0.03	< 0.0001
	Rosi 80 μM	5.3 ± 0.7	0.17 ± 0.02	< 0.0001
	GW9662 10 μM	100.5 ± 69.9	3.2 ± 2.2	0.03
SW403	Kontrolle	10.6 ± 1.9		
	Pio 80 μM	3.8 ± 0.6	0.36 ± 0.05	< 0.0001
	Rosi 80 μM	5.0 ± 1.7	0.47 ± 0.16	< 0.001
	GW9662 10 μM	18.8 ± 16.1	1.8 ± 1.5	0.19

Tabelle 33: IC₅₀ der Behandlungsgruppen

Zusammenfassend konnte in kolorektalen Zelllinien, durch die Behandlung mit PPAR γ -Agonisten, die Sensitivität auf das Chemotherapeutikum 5-FU signifikant gesteigert werden [127].

4 Diskussion

4.1 PPAR γ Expression als Marker für klinisch-pathologische Parameter in Patienten mit KRK

Das KRK stellt bis heute nach dem Lungenkarzinom die häufigste Krebstodesursache in Deutschland dar [4]. Im Laufe der letzten Jahre ist zwar ein Rückgang der altersstandardisierten Sterberate zu verzeichnen, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt allerdings immer noch bei nur 62 % [3]. Aufgrund der großen Heterogenität von KRK mit unterschiedlichem Ansprechen auf Therapien sind einfach zu erhebende Parameter mit prognostischer Aussagekraft wünschenswert [108]. In den letzten Jahrzehnten wurden dazu bereits zahlreiche Tumormarker auf ihre prognostische Wertigkeit überprüft [132, 133]. Gegenstand unserer Untersuchungen war der Einfluss der PPAR γ Expression auf die Tumorbilogie des KRKs sowie die Relevanz der Expression auf das klinische Outcome für Patienten mit KRK. Dafür untersuchten wir zunächst die Korrelation der PPAR γ -Expression mit klassischen klinischen und pathologischen Parametern.

In unserem Studienkollektiv zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen einer DM-Erkrankung und dem Metastasierungsstatus. Allerdings war die Prävalenz von DM-Typ-II mit 13.4 % deutlich höher als die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung in Deutschland. Zahlreiche Autoren konnten bereits in der Vergangenheit ein erhöhtes KRK-Risiko für DM-Erkrankte in epidemiologischen Studien nachweisen [18, 19]. Auch für weitere Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, Leberzellkarzinom, Blasenzellkarzinom, Pankreaskarzinom, Endometriumkarzinom sind solche Assoziationen bekannt. Als mögliche zugrundeliegende Prozesse werden die Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), oxidativer Stress, abnormale Sexualhormone, und gesteigerte Inflammation diskutiert [14]. Der initiale Gedanke zur Untersuchung, ob der HbA1c Wert ein möglicher prognostischer Marker sein könnte, musste nach der Datenerhebung verworfen werden, da von zu wenigen Patienten ein HbA1c Wert erfasst werden konnte. Außerdem waren die Messzeitpunkte der retrospektiven Datenerhebung geschuldet nicht vergleichbar. Die gleiche Problematik ergab sich auch für den BMI-Wert, sodass keine statistischen Analysen durchgeführt werden konnten.

Für das T-Stadium konnten wir in unserer Studienkohorte keine Korrelation mit der Höhe der Expression von PPAR γ finden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Ogino et al.[134], Pancione et al.[52] und Theocharis et al.[135] in Studien basierend auf der Immunhistochemie. Dahingegen konnten Yaghoubizadeh et al.[136] in einer Fall-Kontroll Studie mit 200 eingeschlossenen Proben eine signifikante Korrelation zeigen. Eine niedrige Expression von PPAR γ ist signifikant mit einem fortgeschrittenem T-Stadium assoziiert. In der Studie wurde die Expression mittels PCR im Verhältnis zur Expression von PPAR γ in normaler Dickdarmmukosa gemessen. Die Diskrepanz in den Ergebnissen könnte folglich durch die unterschiedlich angewandte Methodik entstehen. Eine stärkere Transkription muss sich nicht in einer höheren aktiven Proteinmenge äußern. Unter anderem können posttranskriptionelle Prozesse die Proteinbiosynthese beeinflussen [137]. In Zusammenschau der Studien erscheint es fraglich, ob die PPAR γ Expression eine Aussage bezüglich des T-Stadium der Patienten zulässt. Auch für den Lymphknotenstatus konnte in dieser Arbeit keine Korrelation mit der Expression von PPAR γ nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse. So konnten Pancione et al.[52] im Gegensatz zu Theocharis et

al.[135] zeigen, dass eine niedrige Expression von PPAR γ mit einer Metastasierung in Lymphknoten vergesellschaftet ist. Neben dem Lymphknotenbefall ist der Metastasierungsstatus ein wichtiger Faktor für das Outcome von Patienten mit KRK. Nicht metastasierte KRK haben das längste Overall Survival, gefolgt von pulmonal metastasierten KRK. Die schlechteste Prognose innerhalb dieser drei Kohorten zeigen Patienten mit Lebermetastasen [7, 138]. In der in dieser Arbeit untersuchten Gesamtstudienpopulation war der Unterschied im Metastasierungsstatus bezogen auf das Expressionsniveau von PPAR γ gerade nicht signifikant. Es zeichnete sich aus den absoluten Zahlen ab, dass vor allem Lungenmetastasen mit einer starken Expression von PPAR γ vergesellschaftet waren. In einem Direktvergleich der PUL-Kohorte mit der M0-Gruppe zeigte sich eine signifikante Korrelation. Eine hohe Expression von PPAR γ stellte in unserem Kollektiv ein Risiko für die Metastasierung in die Lunge dar. Für Lebermetastasen konnten wir eine solche Assoziation nicht aufzeigen. Es lässt sich also diskutieren, ob die Expression von PPAR γ ein spezifischer prognostischer Faktor bei Patienten mit Lungenmetastasen sein könnte [109]. Widersprüchlich dazu konnten Pancione et al.[52] eine positive Assoziation zwischen der Expression von PPAR γ und dem Metastasierungsstatus finden. Stark exprimierende Fälle waren signifikant häufiger in Patienten mit nicht metastasierendem KRK zu finden. Metastasierte KRK zeigten häufiger eine schwache Expression von PPAR γ . Im Kontrast dazu gelang es Theocharis et al.[135] nicht eine signifikante Assoziation nachzuweisen. Zu erwähnen sei hier, dass in diesem Kollektiv nur Lebermetastasen mit einbezogen wurden. Unsere Ergebnisse konnten die bereits in der Literatur gezeigten positiven Assoziationen von PPAR γ mit dem M0 Status nicht bestätigen. Im Gegenteil zeigten wir, wie bereits erwähnt, eine positive Korrelation zwischen einem hohem PPAR γ Expressionsniveau und der pulmonalen Metastasierung.

Das tumorspezifische Überleben stellt einen der relevantesten Faktoren für Patienten mit KRK dar [138]. In unserem Studienkollektiv zeigte sich in der Gruppe der nicht metastasierten KRK ein signifikant besseres Überleben in den Tumoren mit niedriger PPAR γ Expression. Das mediane Überleben war in dieser Gruppe mit 153 Monaten um 38 Monate länger als in den Tumoren mit starker PPAR γ Expression. Innerhalb der PUL-Kohorte ließ sich eine Trendumkehr beobachten. Aus unseren Analysen zeichnete sich für die pulmonal metastasierten Fälle ein längeres Überleben für Patienten mit stark exprimierenden Tumoren ab. Allerdings war der Unterschied gerade nicht signifikant. Wie bereits angemerkt sollte folglich ein Unterschied der Funktion von PPAR γ in nicht metastasierten Tumoren und KRK mit Lungenmetastasen weiter diskutiert werden. Innerhalb der hepatischen Kohorte konnten wir keine prognostische Relevanz für die PPAR γ -Expression finden. In der Literatur finden sich aktuell vor allem Hinweise, dass eine hohe Expression von PPAR γ mit einem besseren Überleben für Patienten mit KRK assoziiert ist [139]. Allerdings wurde im Gegensatz zu unseren Analysen nicht zwischen M0 und M1 Tumoren differenziert. So konnten Ogino et al.[134] an einem Kollektiv mit 470 Fällen mit KRK zeigen, dass Patienten mit immunhistochemisch positiver Expression von PPAR γ ein signifikant längeres Overall Survival hatten. Mit einer adjustierten HR von 0.43 traf bei Patienten mit positiver Expression von PPAR γ bei weniger als der Hälfte der Patienten, verglichen mit Fällen mit negativer Expression, ein Ereignis ein. Vergleichbare signifikante Ergebnisse konnten von dieser Arbeitsgruppe auch für das karzinomspezifische Überleben gezeigt werden. Auch Pancione et al.[52] und Yaghoubizadeh et al.[136] konnten an kleineren Kollektiven zeigen, dass eine hohe Expression von PPAR γ mit einem besseren kumulativen Überleben vergesellschaftet ist. Neben den positiven Berichten finden sich in der Literatur auch Studien, die keinen Zusammenhang darstellen konnten. Teocharis et al.[135] und Gustafsson et al.[97] fanden keinen signifikanten

Unterschied in Bezug auf das Überleben der Patienten. Zudem konnten Gustafsson et al.[140] und Yaghoobizadeh et al.[136] zeigen, dass die Expression von PPAR γ in Tumorgewebe verglichen mit normaler Dickdarmmukosa supprimiert ist. Auch diese Veränderung des Expressionsniveaus legt unterschiedliche Funktionen von PPAR γ abhängig vom Stadium der Tumorphagenese nahe. Zudem zeigten unsere RNA-Analysen an dem frei zugänglichen Tumorkollektiv von Sheffer et al.[125] analog zu unserem Kollektiv ein signifikant besseres Überleben in der Gruppe der niedrig exprimierenden Tumore.

Die insgesamt eher widersprüchlichen Ergebnisse über den Einfluss von PPAR γ auf die Tumorphagenese und das klinische Outcome sollten weiterhin kontrovers diskutiert werden. Besonders unter dem Aspekt, dass PPAR γ -Agonisten bereits für die Therapie von DM-Typ-II zugelassen sind und in Deutschland somit ein kostengünstiges Medikament zur Verfügung steht [15].

4.2 Interaktion von PPAR γ mit β -Catenin

Zahlreiche Studien zeigen, dass eine starke immunhistochemische Färbung von β -Catenin mit einer schlechteren Prognose und einem schlechteren Überleben für Patienten mit KRK vergesellschaftet ist [141, 142]. Interaktionen zwischen PPAR γ und β -Catenin könnten folglich von klinischer Relevanz sein. Aufgrund dessen untersuchten wir auch in unserem Studienkollektiv den Zusammenhang zwischen der PPAR γ und der β -Catenin Expression. Hierbei zeigte sich, dass die PPAR γ Expression signifikant mit der β -Catenin Expression korreliert. Eine hohe Expression von PPAR γ war mit einer starken Expression von β -Catenin vergesellschaftet. Die gleiche Annahme galt auch in die andere Richtung. Diese Daten basieren auf der immunhistochemischen Analyse der beiden Proteine. Auch die von uns durchgeführte RNA-Analyse an dem frei verfügbaren Tumorkollektiv (TCGA)[123], zeigte eine signifikant positive Korrelation der RNA-Expression. Eine starke RNA-Expression von PPAR γ war mit einer starken RNA-Expression von β -Catenin assoziiert. In der Literatur hingegen zeigt sich eine negative Korrelation zwischen den beiden Proteinen. So ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg regelmäßig in KRK hochreguliert, während die Aktivität von PPAR γ oftmals supprimiert ist [67, 143]. Dabei stören Mutationen in der bekannten TCF/LEF Bindungsdomäne die Interaktion zwischen den beiden Proteinen [22]. PPAR γ kann unter der Bedingung eines intakten APC-Proteins die β -Catenin Expression supprimieren. Sobald die Tumorgenese initiiert worden ist, scheint PPAR γ keinen Einfluss mehr auf die β -Catenin-Expression zu haben. Das möglicherweise tumorsuppressive Potential von PPAR γ ist demnach vor allem in frühen Stadien der Tumorgenese relevant [144]. Im Einklang dazu zeigten Liu et al.[145], dass die Einleitung der proteasomalen Degradation durch PPAR γ nur für „normales“ β -Catenin möglich ist. Onkogenes β -Catenin entgeht dem proteasomalen Abbau durch Inhibierung der PPAR γ -Aktivität über die TCF/LEF Domäne. In Zellkulturexperimenten von Panza et al.[104] löste ein PPAR γ -Agonist in verschiedenen Zelllinien widersprüchliche Reaktionen aus. In CaCo-2 Zellen und HT29 Zellen ließ sich durch Zugabe des PPAR γ -Agonisten die β -Catenin-Expression supprimieren. In HCT116 Zellen hingegen war ein Anstieg der Expression von β -Catenin zu beobachten. Diese konträren Ergebnisse könnten sich durch unterschiedliche Mutationszustände von β -Catenin und dem APC-Protein erklären lassen. Die Annahme, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu einer Inhibierung von PPAR γ führt, während die Aktivierung von PPAR γ zu einer Inhibierung des Wnt-Signalwegs führt, kann anhand unseres

Kollektivs nicht bestätigt werden [70]. Da die Interaktion zwischen den beiden Systemen auf posttranskriptionellem Weg geschieht, lässt sich allerdings über die Proteinmenge/RNA-Menge keine direkte Aussage auf die Aktivität der Proteine schließen [9, 67]. Zusätzlich scheint die Interaktion zwischen den beiden Systemen abhängig vom Mutationsstatus von APC sowie β -Catenin zu sein [22, 104]. Mit diesem Hintergrund lässt sich die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse relativieren, da APC in über 80 % der nicht-hypermutierten KRK mutiert ist [123]. Außerdem scheint die Aktivität von PPAR γ während des Übergangs vom Adenom zum Adenokarzinom abzunehmen [53]. Insgesamt verdichten sich die Ergebnisse dahingehend, dass die tumorsuppressiven Eigenschaften von PPAR γ vor allem in den frühen Phasen der Entstehung von KRK eine wichtige Rolle spielen [22].

Auch zeigten sich in unserer Studienpopulation, wie bereits unter Punkt 4.1 diskutiert, Unterschiede im Expressionsniveau abhängig vom Metastasierungsstatus. Pulmonal metastasierte Fälle zeigten mit einem Mittelwert von 156.9 eine deutliche stärkere Expression als die M0- (123.7) und die HEP-Kohorte (128.1). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Abhängigkeit der Funktion von PPAR γ von der bestehenden Tumorbiologie. Einen Vergleich mit normaler Dickdarmmukosa führten wir allerdings nicht durch. Zudem ist bekannt, dass PPAR γ Agonisten über die Inhibierung von STAT3, PI3K/Akt [67, 106] und über die Aktivierung von DKK1 [146] und GSK3- β [70] den Wnt-Signalweg hemmen und die β -Catenin Level reduzieren. Es scheint also zahlreiche weitere Signalwege zu geben, die Einfluss nehmen auf die Interaktion zwischen PPAR γ und β -Catenin und mögliche Erklärungsansätze für die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur liefern könnten.

4.3 Interaktion von PPAR γ mit p53

Der Zell-Zyklus-Arrest kann durch p53, einem Tumorsuppressor, kontrolliert werden. Als Grundlage dient die Reduktion der Transkription von Genen, die mit dem Zell-Zyklus assoziiert sind. Vermittelt wird dieser Prozess über den „p53-DREAM-pathway“. Dieser Signalweg hat Einfluss auf Restriktionspunkte des Zellzyklus, wie dem G1/S, G2/M und dem Spindelkontrollpunkt während der Mitose [147]. Aufgrund dieser zentralen Rolle von p53 ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen p53 und PPAR γ erstrebenswert. In unserem Studienkollektiv zeigte sich, dass eine hohe Expression von PPAR γ signifikant mit einem deregulierten p53-Protein einhergeht. Dies könnte mitunter eine mögliche Erklärung für das schlechtere Überleben der stark exprimierenden Tumore in der M0-Kohorte sein. Bekannt ist bereits, dass KRK mit einer p53 Mutation ein schlechteres Überleben zeigen, als nicht mutierte Tumore [148].

In weiteren Studien wurde bereits für andere Tumorentitäten der Zusammenhang zwischen der PPAR γ -Aktivierung und der p53-Expression untersucht. Im Nierenzellkarzinom [74] und im Pankreaskarzinom [75] konnte durch eine PPAR γ -Aktivierung die Induktion des Zell-Zyklus-Arrests erreicht werden. Auch Han et al. [149] beobachteten, dass PPAR γ Liganden in Zelllinien des Cholangiokarzinoms die Expression von p53 sowie die von wichtigen p53 Zielgenen (p21^{WAF1/Cip1} und GADD45) zeit- und dosisabhängig steigern konnten. Darüber hinaus konnten Bonofiglio et al. [150] und Nagamine et al. [151] für Zellen des Mammakarzinoms bzw. des Magenkarzinoms zeigen, dass PPAR γ Agonisten die Expression von p53 und p21^{WAF1/Cip1} verstärken können. P21 hat, neben antiproliferativen Eigenschaften, als CDK Inhibitor hemmende Wirkung auf den Zell-Zyklus und wird als mögliches „target“ für die Tumorthherapie

untersucht [152]. Diese zahlreichen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der von uns gefundenen Assoziation zwischen dem p53-Status und der PPAR γ -Expression. Ursächlich dafür könnte die abweichende Methodik der Studien sein. Während wir die Expressionsstärke als Korrelationsmarker verwendeten, wurde in den meisten Studien PPAR γ mittels Liganden aktiviert. Weitere Untersuchungen bleiben somit unumgänglich um die Rolle von PPAR γ bezogen auf die p53-Funktion in KRK zu klären. Des Weiteren bleibt zu untersuchen, ob sich die Interaktion im Laufe der Tumorphagenese verändert. Möglicherweise könnte dies eine Erklärung für die von uns beobachtete Trendumkehr der PPAR γ -Funktion hinsichtlich des Überlebens abhängig vom Metastasierungsstatus liefern (vergleiche 4.1).

4.4 Einfluss von PPAR γ auf die Proliferation von KRK-Zelllinien

Der Einfluss von PPAR γ auf die Proliferation von Zellen ist ein weiterer wichtiger Kernpunkt für die Untersuchung der Eigenschaften von PPAR γ . Die Proliferation stellt eine der wichtigsten biologischen Fähigkeiten in Bezug auf das Tumorstadium dar [126].

In unseren Zellkulturexperimenten führte der Verlust des PPAR γ Gens durch transienten Knockdown in der Zelllinie SW403 zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. PPAR γ scheint folglich fördernd auf die Regulation der Proliferation einzuwirken [127]. Widersprüchlich dazu finden sich in der Literatur aktuell vor allem Nachweise, dass ein Verlust des PPAR γ Gens zur Tumorstadium führt. So sind „Loss-of-function“- Mutationen im PPAR γ -Gen mit der Entstehung von KRK vergesellschaftet [54]. Capaccio et al.[55] entdeckten eine Keimbahnmutation im Exon 5 von PPAR γ , die mit der Entstehung von Dickdarmpolypen und Dyslipidämie assoziiert ist. Lin et al.[153] konnten zeigen, dass vor allem Männer mit einem PPAR γ rs3856806 C>T Polymorphismus ein größeres Risiko haben, an einem KRK zu erkranken. Auch ein Knockdown von PPAR γ im Mausmodell war signifikant mit einem schnellerem Tumorstadium assoziiert [98]. Darüber hinaus stieg in einem Mausmodell nach der Etablierung eines hemizygoten Knockdowns von PPAR γ die Inzidenz von KRK nach AOM-Behandlung signifikant an [144]. Die von uns demonstrierten tumorfördernden Eigenschaften von PPAR γ stehen zunächst im Widerspruch mit den bereits veröffentlichten Studien. Allerdings muss beachtet werden, dass die von uns durchgeführte in vitro Studie nicht direkt vergleichbar mit den hier vor allem angeführten in vivo Ergebnissen ist. Einschränkend muss zusätzlich erwähnt werden, dass wir für die Zelllinie HT29 in den Versuchen keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und der KD-Gruppe gefunden haben.

Interessanterweise lieferten unsere Experimente mit dem PPAR γ Inhibitor GW9662 auch Rückschlüsse auf tumorfördernde Eigenschaften von PPAR γ . Die Behandlung mit dem PPAR γ Inhibitor führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität in den Zelllinien SW403 und HT29. Sowohl die Behandlung mit dem Inhibitor als auch die Etablierung des KDs führten somit in unseren Experimenten zur Reduktion der Zellviabilität. Möglicherweise könnte demnach die Inhibition von PPAR γ einen Vorteil für Patienten mit KRK bringen [127]. Im Einklang damit steht eine Studie von Tsukahara et al.[154], in der die Inhibition von PPAR γ mit cyclischer Phosphatid-Säure zur Hemmung der Proliferation in der Zelllinie HT29 führte.

In unseren nachfolgenden Experimenten mit PPAR γ -Agonisten zeigte sich, passend zu unseren Ergebnissen aus den Inhibitorversuchen, eine Steigerung der Proliferationsrate. Die Behandlung mit Pio- und Rosiglitazon 80 μ M führte sowohl in der Zelllinie SW403 als auch in

den HT29 zu einer signifikanten Zunahme des Lebendzellanteils nach 96 Stunden. Die Aktivierung des PPAR γ -Gens könnte somit zu einem progressiverem Tumorverhalten beitragen. Limitierend muss ergänzt werden, dass die Behandlung mit Rosiglitazon 20 μ M zu einer Abnahme des Lebendzellanteils um 7 % führte. Die Funktion von PPAR γ -Agonisten scheint damit dosisabhängig zu sein [127]. Auch Choi et al.[77] demonstrierten, dass Pioglitazon das Tumorwachstum in APC-mutierten kolorektalen Zellen in vitro und in vivo förderte. Im Mausmodell wiesen Saez et al.[62] und Lefebvre et al.[61] eine Zunahme von Kolonpolypen nach Therapie mit PPAR γ -Agonisten nach. Diese Beobachtungen bleiben allerdings umstritten, da in mehreren Studien vor allem eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung von ACF nachgewiesen werden konnte [59, 60]. Auch weitere Forschungsgruppen zeigten bereits antiproliferative Eigenschaften von PPAR γ auf. Rosiglitazon reduzierte in Experimenten mit den Zelllinien HT29 und CaCo-2 signifikant die Proliferation [104]. Takano et al.[155] legten in den Zelllinien SW480 und HT29 einen dosisabhängigen hemmenden Einfluss auf die Zellviabilität durch die Gabe von Pioglitazon und Ciaglitazon dar. Dieser Effekt scheint durch die PPAR γ -abhängige Runterregulierung der Gene COX-2 und Cyclin D1 vermittelt zu werden [155, 156]. Darüber hinaus induzierte die Behandlung mit Büffelmolke PPAR γ -abhängig einen Proliferationsstopp in kolorektalen Zelllinien [157]. Zudem hatte die Überexpression von PPAR γ in kolorektalen Zelllinien (CaCo-2 und DLD-1) mit niedriger PPAR γ Expression einen hemmenden Einfluss auf die Proliferationsrate [158]. Bereits untersucht wurde auch, ob die Einnahme von TZD einen Effekt auf die Inzidenz von KRK im Menschen hat. Chen et al.[63] konnten in einer Fall-Kontroll-Studie für Patienten mit DM ein reduziertes Risiko für die Entstehung eines KRKs bei Einnahme von TZD zeigen. Im Einklang dazu zeigte Chang et al.[64] in einer nationalen Fallstudie ein reduziertes Risiko für das KRK unter Rosiglitazon-Gabe. Govindarajan et al.[65] beobachteten allerdings keine Veränderung der Inzidenz für KRK unter Therapie mit TZD. In unserem Studienkollektiv konnten wir aufgrund der geringen Anzahl an Patienten, die TZD (n=1) eingenommen haben, leider keine relevante statistische Aussage über den Zusammenhang zwischen der Einnahme von TZD und Klinisch-Pathologischen Parametern treffen.

In anderen Tumorentitäten konnten, analog zu unseren Studienergebnissen, bereits mehrfach tumorprogressive Eigenschaften für PPAR γ nachgewiesen werden. Im Blasenkarzinom führte eine Steigerung der Aktivität von PPAR γ durch gain-of-function Mutationen zum Tumorwachstum [78]. Pro Tumor Eigenschaften von PPAR γ konnten darüber hinaus in Hirnmetastasen beobachtet werden. Der PPAR γ -Antagonist T0070907 senkte signifikant die Tumorzellproliferation [79].

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse aus Knockdown-, Inhibitor- und Agonistenbehandlung in sich konsistente, fördernde Eigenschaften bezogen auf das Tumorwachstum von PPAR γ . Wie oben ausführlich diskutiert überwiegen in der Literatur aktuell die Hinweise, dass PPAR γ protektiv gegenüber Tumorwachstum von KRK wirkt. Allerdings wurden auch einige Gegenberichte veröffentlicht, sodass die genauen molekularen Mechanismen weiter diskutiert werden sollten.

4.5 Einfluss von PPAR γ auf die Proliferation von KRK-Zelllinien unter Hypoxie

Um den Aspekt der Hypoxie auf die PPAR γ -Funktion zu untersuchen, haben wir die Proliferationsexperimente auch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Kurz zusammengefasst haben wir in KRK-Zelllinien keine relevanten Unterschiede in der Funktion von PPAR γ auf die Proliferation unter Hypoxie, verglichen mit der Normoxie, gefunden (vergleiche Abschnitt 3.3.3). Konkret zeigte sich durch die Inhibition von PPAR γ erneut eine signifikante Reduktion der Proliferation. Die Behandlung der Zellen mit hohen Konzentrationen (80 μ M) der PPAR γ -Agonisten führte, wie schon unter Normoxie, zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsrate. In den HT29 konnte fast eine Verdopplung der Zellviabilitätsrate erzielt werden, in den SW403 immerhin eine Steigerung um das Anderthalbfache. Unsere Untersuchungen lieferten somit keinen Hinweis auf eine vom Sauerstoffgehalt abhängige Funktion von PPAR γ in KRK-Zelllinien. In der Literatur wird hingegen eine besondere Rolle von PPAR γ unter Bedingungen der Hypoxie diskutiert [128, 130]. Bereits bekannt ist, dass Hypoxie in verschiedenen Zelllinien zu einer Expressionsabnahme von PPAR γ führt [130, 159, 160]. In pulmonalen Endothelzellen konnte zudem die durch Hypoxie induzierte Aktivität von HIF-1 α , Endothelin-1 und NF κ B durch die Behandlung mit Rosiglitazon abgeschwächt werden [161]. Im Mausmodell konnte die Behandlung mit Pioglitazon das durch Hypoxie induzierte Auftreten von intrauterinen Wachstumsretardierungen reduzieren [131]. Zudem konnte in Nervenzellen gezeigt werden, dass der selektive PPAR γ -Modulator Amorfrutin B vor hypoxisch und ischämisch induzierter Neurodegeneration schützt [162]. Die Aktivierung von PPAR γ scheint somit in zahlreichen Kontexten vor Hypoxie-bedingten Schäden zu schützen. In unseren Untersuchungen zum KRK konnte allerdings kein protektiver Effekt für PPAR γ vor Hypoxie nachgewiesen werden.

4.6 Einfluss von PPAR γ auf reaktive Sauerstoffspezies

Die gesteigerte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entsteht vorwiegend durch eine Dysfunktion in der mitochondrialen Atmungskette [163]. Die Balance zwischen ROS und Antioxidantien spielt eine zentrale Rolle in der Tumorphagenese. Erhöhte Konzentrationen von ROS wurden in zahlreichen Tumorentitäten gefunden. Diese scheinen sowohl die Tumorentstehung als auch die Tumorprogression zu fördern und stellen somit einen weiteren möglichen Angriffspunkt in der Tumortherapie dar [70, 164]. Aufgrund dieser Vorkenntnisse untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Elesclomol-induzierter ROS-Produktion und der PPAR γ -Aktivität. Wir konnten sowohl für die Knockdown- als auch für die Behandlungsgruppe mit dem Inhibitor GW9662 einen protektiven Effekt von PPAR γ auf die Bildung von ROS in kolorektalen Zelllinien zeigen. Der transiente Knockdown des PPAR γ -Gens bzw. die Inhibition führte, verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe, zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität unter Elesclomol-Behandlung. Die Agonistenbehandlung führte allerdings nicht zu der von uns erwarteten Steigerung der Protektionsfunktion, sondern tendenziell auch zu einem stärkeren Sterben der Zellen oder bei Behandlung mit höheren Konzentrationen zu keiner Veränderung verglichen mit der Kontrollgruppe. Ursächlich könnte hierfür eine nach Aktivierung von PPAR γ auftretende Herunterregulierung der PPAR γ -Expression sein. Diese lässt sich im bereits zuvor gezeigten Western Blot in der Abbildung 21 für beide Zelllinien beobachten. Möglicherweise sind bisher

ungeklärte Feedbackmechanismen für diesen Effekt verantwortlich, sodass in gewissen Zeitspannen die Agonistenbehandlung der PPAR γ -Inhibition gleicht. Diese dosisabhängigen Einflüsse der PPAR γ Aktivierung sollten zukünftig weiter untersucht werden. Im Einklang zu unseren Ergebnissen wird aktives PPAR γ in der Literatur als Schutzfaktor vor Bildung von ROS diskutiert. In umbilikalenden Endothelzellen konnte die LPS-induzierte ROS-Produktion durch die Gabe von Rosiglitazon signifikant abgeschwächt werden [81]. Auch in glatten Muskelzellen führte die lentiviral vermittelte gesteigerte Expression von PPAR γ zu einer reduzierten Induktion von ROS [165]. In Haarzellen der Cochlea wurde durch die Gabe von Pioglitazon die Gentamicin-induzierte ROS-Produktion abgeschwächt [122]. Im Mausmodell zur Untersuchung des Leberversagens während der Sepsis zeigte sich ferner durch die Aktivierung von PPAR γ eine verminderte ROS-Bildung [166]. Zu berücksichtigen bleibt, dass die eben diskutierten Forschungsergebnisse, im Gegensatz zu unseren, nicht in Tumorzellen erzielt wurden.

Um unsere These, dass PPAR γ eine schützende Wirkung vor ROS hat, zu prüfen, untersuchten wir des Weiteren wichtige Gene des oxidativen Stresses (SOD1, GPX1, CAT, UCP2) [122]. Für SOD1 zeigten sich nach Agonisten- bzw. Inhibitorgabe von PPAR γ in unserer Expressionsanalyse inkongruente Ergebnisse in den verschiedenen kolorektalen Zelllinien, sodass weitere Schlüsse über den Einfluss von SOD1 und PPAR γ auf die ROS-Produktion anhand unserer Resultate schwer zu ziehen waren. In der Literatur konnte für die Superoxiddismutase in glatten Muskelzellen [165] bzw. in den Haarzellen der Cochlea [122] gezeigt werden, dass die gesteigerte Expression von PPAR γ zu einer Erhöhung der SOD1 Aktivität führt. Diese bekannten Regulationsmechanismen konnten wir nicht bestätigen, sodass eine SOD1 vermittelte Schutzfunktion von PPAR γ vor ROS in Tumorzellen des KRK fraglich bleibt. Für das Antioxidans GPX1 beobachteten wir eine niedrigere Expression sowohl nach Agonisten- als auch nach Inhibitorgabe. Ursächlich könnte hierfür der bereits zuvor diskutierte Feedbackmechanismus nach Behandlung mit PPAR γ Agonisten sein. Die Expression des Antioxidans CAT konnte in beiden Zelllinien durch die Behandlung mit PPAR γ -Agonisten gesteigert werden. CAT stellt somit einen potenziellen Erklärungsansatz für die Schutzfunktion von PPAR γ vor ROS dar. Limitierend muss erwähnt werden, dass der Inhibitor GW9662 in der Zelllinie SW403 auch zu einer geringen CAT-Expressionssteigerung geführt hat. Genauere Analysen zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen CAT und PPAR γ im KRK bleiben notwendig. In Haarzellen der Cochlea konnte bereits eine PPAR γ -vermittelte Expressionssteigerung von CAT beobachtet werden [122]. Für UCP2 konnte bereits in verschiedenen Zellen eine hemmende Wirkung in Bezug auf die ROS Bildung nachgewiesen werden [122, 167]. Die Untersuchung der UCP2 Expression in der Zelllinie HT29 lieferte einen weiteren Erklärungsansatz für die protektive Funktion von PPAR γ vor ROS. Die Aktivierung mit Rosiglitazon führte in unseren Untersuchungen zu einer signifikanten Expressionssteigerung von UCP2, während die Inhibition mit GW9662 zu einer signifikanten Expressionsabnahme von UCP2 führte. Der Schutz von PPAR γ vor ROS könnte somit unter anderem über eine „UCP2-PPAR γ -Achse“ vermittelt werden. Auch im Tiermodell führte die orale Einnahme von Rosiglitazon zur Hochregulierung von UCP2 und somit zur Reduktion des oxidativen Stresses [168]. Darüber hinaus konnte in Adipozyten bereits eine Interaktion zwischen PPAR γ und dem Intron 1 von UCP2 gezeigt werden, sodass eine gegenseitige Regulation nahe liegt [169].

Zusammenfassend stellen vor allem die eben beschriebene „UCP2-PPAR γ -Achse“ sowie die PPAR γ -vermittelten Expressionsveränderungen von CAT mögliche Signalwege zur

protektiven Funktion von PPAR γ vor ROS im KRK dar. Weitere umfassende Untersuchungen bleiben notwendig, um die Funktion von PPAR γ in Bezug auf die ROS Produktion im KRK zu verstehen.

4.7 Einfluss von PPAR γ auf die Chemotherapiesensitivität

Um die klinische Relevanz von PPAR γ für Patienten mit KRK einschätzen zu können, haben wir im nächsten Schritt untersucht, welchen Einfluss die Gabe von PPAR γ -Agonisten/Inhibitoren auf die 5-FU-Chemotherapiesensitivität hat. 5-FU ist ein Analogon des natürlich vorkommenden Pyrimidins Uracil und wird im Rahmen des multimodalen Therapiekonzeptes regelhaft als Zytostatikum zur Behandlung des KRKs eingesetzt [2, 170]. In unseren Experimenten zeigte sich, dass die Vorbehandlung von kolorektalen Zelllinien mit PPAR γ -Agonisten zu einer signifikanten Steigerung der Chemotherapiesensitivität führt. In den Zelllinien HT29 war ohne Vorbehandlung der Zellen eine fünffach höhere Dosierung des Zytostatikums 5-FU notwendig, um die Hälfte der maximal möglichen Hemmung zu erreichen. Auch in den SW403 zeigte sich eine Verdopplung der IC₅₀ in der Kontrollgruppe [127]. Eine zusätzliche Gabe von Glitazonen bei Patienten mit KRK könnte somit möglicherweise die Therapieeffektivität von 5-FU steigern und eine Dosisreduktion des nebenwirkungsreichen Zytostatikums 5-FU möglich machen [171]. Im Einklang mit den Agonisten-Experimenten führte der PPAR γ -Inhibitor zu einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber dem Pyrimidinanalogon 5-FU. Limitierend muss erwähnt werden, dass dieser Unterschied für die Zelllinien SW403 nicht signifikant war. Auch andere Autoren wie Lau et al.[87] und Zhang et al.[172] konnten unter der Therapie mit Rosiglitazon eine gesteigerte 5-FU induzierte Apoptoserate in den Zellen des KRKs beobachten. Für das Pyrimidinanalogon 5-FU ist bereits bekannt, dass es unter anderem über die Modulation der Bcl-2 Proteinfamilie (u. a. Bcl-2, BAX, BAK) die Apoptose in kolorektalen Zellen einleitet [173]. Auch die PPAR γ -Aktivierung führt zu einer gesteigerten Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und Bak und einer Inhibierung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl2 [80]. Diese Schnittstelle könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die gesteigerte Chemotherapiesensitivität von 5-FU unter PPAR γ -Aktivierung sein. Weitere Studien zeigten, dass die Apoptose durch PPAR γ Liganden über eine Runterregulierung von Survivin, die Unterdrückung von NF κ B und die Stimulierung des Krüppel-like factors induziert wird [86]. Zukünftig bleibt die Untersuchung des Einflusses der PPAR γ -Aktivierung auf Gene des Pyrimidinstoffwechsels interessant, um weitere mögliche Erklärungsmodelle für die gesteigerte Chemotherapiesensitivität unter PPAR γ -Aktivierung zu finden.

In Zusammenschau der Ergebnisse mit der Proliferation scheint die Aktivierung von PPAR γ zunächst zu einer gesteigerten Proliferation von kolorektalen Zelllinien zu führen (vergleiche Abschnitt 3.3.2) und somit eher tumorprogressive Eigenschaften zu fördern. Durch die gesteigerte 5-FU-Chemotherapiesensitivität in kolorektalen Zellen unter der Gabe von PPAR γ -Agonisten könnte die Etablierung einer Kombinationstherapie beider Wirkstoffe möglicherweise trotzdem einen Vorteil für Patienten mit KRK darstellen. Randomisierte klinische Studien bleiben in Zukunft notwendig, um den in vitro beobachteten Effekt in vivo zu überprüfen. Zu erwähnen bleibt auch, dass in Phase 1 Studien für den PPAR γ -Agonist Efatutazon bereits ein ausreichendes Sicherheitsprofil für dessen Einnahme in Patienten mit KRK gezeigt werden konnte [174, 175].

4.8 Limitationen

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit sollten nachfolgend diskutierte limitierende Faktoren berücksichtigt werden.

Aufgrund der von uns durchgeführten aufwändigen immunhistochemischen Methodik und Analysen umfasst unsere Studienpopulation nur eine Gesamtfallzahl von 246 Schnitten. Dies ist insbesondere bei den Analysen der Überlebenszeiten kritisch zu betrachten, da die Kaplan-Meier Schätzer zur Vermeidung von Verzerrungen durch den Metastasierungsstatus nur innerhalb der Subkohorten mit einer jeweiligen Fallzahl von 82 durchgeführt wurden. Dennoch konnten unsere Ergebnisse durch RNA-Analysen an dem frei verfügbaren Tumorkollektiv von Sheffer et al. mit 178 Fällen bestätigt werden. Einschränkend ist außerdem zu erwähnen, dass durch die Wahl der Immunhistochemie zur Bestimmung des Expressionsniveaus von PPAR γ kein „echtes“ quantitatives Verfahren zum Einsatz gekommen ist. Der H-Score ist dennoch als semiquantitative Messmethodik in der Pathologie zur Auswertung immunhistochemischer Präparate etabliert [113, 114].

Zudem wählten wir als Studiendesign eine Fall-Kontroll-Studie. Das Studienkollektiv ist demzufolge stark vorselektiert und anfällig für systematische Fehler. Zur Steigerung der Aussagekraft und Reduktion von Verzerrungen durch Störvariablen führten wir deshalb ein „matching“ für die folgenden Parameter durch: Tumorlokalisierung, Tumorgrading und pT-Stadium. Weitere möglicherweise beeinflussende Parameter, wie zum Beispiel das Geschlecht und Alter, blieben in unserer Arbeit unberücksichtigt. Für das Geschlecht konnten wir mittels Chi-Quadrat-Test ein Bias ausschließen. Für die Variable Alter zeigte sich allerdings eine signifikante unterschiedliche Verteilung in den verschiedenen Kohorten. Die Überlebensdaten wurden allerdings nur innerhalb einer Kohorte (M0, PUL, HEP) beurteilt und nicht gruppenvergleichend, sodass hierfür der unterschiedliche Altersmedian in den einzelnen Kohorten keine Rolle spielt. Außerdem konnten wir einzelne unserer Fragestellungen aufgrund des retrospektiven Studiendesigns der Fall-Kontroll-Studie nicht beurteilen, da sich zum Beispiel die Exposition mit der Einnahme von TZD im Nachhinein als zu selten herausgestellt hat. Auch die Erhebung des HbA1c-Wertes zur Etablierung eines möglichen prognostischen Markers für Patienten mit KRK war durch das retrospektive Studiendesign nicht möglich. Dies hätte durch eine prospektive Studie, die allerdings meist deutlich kosten- und zeitintensiver ist, vermieden werden können.

Zudem sollten auch die Ergebnisse der Zellkulturexperimente kritisch betrachtet werden. Die Beobachtungen über das Proliferationsverhalten unter PPAR γ -Agonisten/Inhibitorbehandlung, und oxidativem Stress, sowie über Chemotherapiesensitivität gegenüber 5-Fluorouracil basieren nur auf zwei verschiedenen kolorektalen Zelllinien (SW403 und HT29). Die Durchführung der Experimente an weiteren kolorektalen Zelllinien hätte die Relevanz der Studie steigern können. Insbesondere da einzelne Ergebnisse der Zellviabilitätsuntersuchungen nicht in beiden Zelllinien beobachtet werden konnten. Zudem tragen die kolorektalen Zelllinien HT29 und SW403 beide eine Basenaustauschmutation im APC-Gen [176]. In der Literatur wird vor allem ein tumorprädiktiver Einfluss von PPAR γ in frühen Stadien ohne APC-Mutation diskutiert. Die Durchführung der gleichen Experimente an kolorektalen Zelllinien ohne APC-Mutation hätte ein größeres Spektrum der Tumorpathogenese von KRK abbilden können [47, 53, 56]. Da eine APC-Mutation in den meisten kolorektalen Karzinomen gefunden wird, haben unsere Untersuchungen dennoch für den Großteil der Patienten mit KRK klinische Relevanz

[7, 8]. Darüber hinaus sollten zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse *in vivo* Studien durchgeführt werden, um ein geeignetes biologisches Modell für den Einsatz von TZD bei Patienten mit KRK zu erschaffen.

4.9 Ausblick

Aufgrund der großen Heterogenität von KRK und unterschiedlichem Therapieansprechen ist die Etablierung von einfach zu erhebenden prognostischen Parametern zukünftig erstrebenswert [108]. Mit dieser Arbeit wollten wir durch die Charakterisierung der PPAR γ -Funktion im KRK dessen Nutzen als Prognosemarker untersuchen. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen einer starken Expression von PPAR γ und einer pulmonalen Metastasierung [109]. Darüber hinaus konnten wir in unserer M0-Kohorte sowie in der RNA-Analyse des Sheffer et al. Kollektivs [125] zeigen, dass eine hohe PPAR γ Expression mit einem schlechteren Überleben vergesellschaftet ist. Unsere Ergebnisse liefern erste Hinweise, dass die PPAR γ -Expression Rückschlüsse auf die Tumorbiologie zulässt. Möglicherweise könnte das PPAR γ -Expressionsniveau zukünftig einen Faktor darstellen, der über den unterschiedlichen Einsatz und Dosierungen von Chemotherapeutika mitentscheidet. Idealerweise erhalten Patienten zukünftig möglichst individualisierte Therapieschemata, um nicht notwendige aggressive Therapien mit starken Nebenwirkungen zu vermeiden [177]. Einen weiteren einfach zu untersuchenden Prognosemarker, vor allem für Patienten mit DM-Typ-II und KRK, stellt der HbA1c dar. Retrospektiv konnten wir keine Aussage über den HbA1c-Wert treffen, sodass im Rahmen einer prospektiven Studie die Messung des HbA1c-Wertes zur Untersuchung der Eignung von HbA1c als prognostischen Marker erfolgen sollte.

Basierend auf den Ergebnissen unserer Zellkulturexperimente scheint die weitere Charakterisierung von PPAR γ im KRK vielversprechend. Insbesondere die von uns gezeigte Steigerung der Proliferationsrate durch die Gabe von PPAR γ -Agonisten sowie die Zunahme der Chemotherapiesensitivität von 5-FU in Zellen des kolorektalen Karzinoms machen nachfolgende klinische Studien notwendig. Der Einsatz von TZD in Patienten mit KRK könnte womöglich neben den etablierten klassischen Chemotherapeutika, mit oftmals erheblichen Nebenwirkungen, das Überleben von Patienten mit KRK steigern und dabei die Lebensqualität der Patienten nicht weiter einschränken. Aufgrund unserer gewonnenen Grundlage sollte der Einsatz von PPAR γ -Agonisten wie Rosiglitazon und Pioglitazon gemeinsam mit 5-FU in Patienten mit KRK in klinischen Studien überprüft werden. Zudem sollte nach möglichen Erklärungsansätzen für die Interaktion zwischen PPAR γ und 5-FU gesucht werden. 5-FU ist ein Pyrimidinanalogon und hemmt zusätzlich die Thymidilat-Synthase, ein Schlüsselenzym der Pyrimidinbiosynthese [178]. Die Untersuchung von Genen, die eine Rolle im Pyrimidinstoffwechsel spielen, könnte ferner zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen PPAR γ und 5-FU beitragen.

Zusammenfassend ergaben sich in unseren klinisch-pathologischen Analysen und Zellkulturexperimenten zahlreiche Hinweise auf eine mögliche klinische Relevanz für den Einsatz von PPAR γ -Agonisten in Patienten mit KRK. Zukünftig sind vor allem randomisiert kontrollierte Studien notwendig, um die mögliche klinische Bedeutung von PPAR γ -Agonisten für Patienten mit KRK zu überprüfen.

Literaturverzeichnis

1. Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 479-507.
2. *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019*, AWMF.
3. *Darmkrebs*. 2019 23.02.2020; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html.
4. *Gastrointestinale Tumore - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 2013, Tumorzentrum München: München.
5. Stolte, M., *Pathologie*. 2013, Berlin [u.a.]: Springer. 1 Online-Ressource (XVIII, 1006 S.).
6. Wittekind, C. and U.f.I.C. Control, *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*. 2020, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. (XXI, 336).
7. Dekker, E., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1467-1480.
8. Pino, M.S. and D.C. Chung, *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2059-72.
9. Jansson, E.A., et al., *The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1460-5.
10. Petersen, C.P. and P.W. Reddien, *Wnt signaling and the polarity of the primary body axis*. Cell, 2009. **139**(6): p. 1056-68.
11. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
12. Issa, J.P., *Colon cancer: it's CIN or CIMP*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 5939-40.
13. *Diabetes Mellitus*. 2016 11.03.2020; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html.
14. Li, W., et al., *Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 327.
15. *Nationale Versorgungs Leitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes*. 2013, AWMF.
16. Arastéh, K., *Innere Medizin*. 2018, Stuttgart: Thieme. 691-718.
17. Katzung, B.G., *Basic & clinical pharmacology*. 2009, New York [u.a.]: McGraw-Hill Medical. 727-751.
18. Gonzalez, N., et al., *2017 update on the relationship between diabetes and colorectal cancer: epidemiology, potential molecular mechanisms and therapeutic implications*. Oncotarget, 2017. **8**(11): p. 18456-18485.
19. Pang, Y., et al., *Diabetes, plasma glucose and incidence of colorectal cancer in Chinese adults: a prospective study of 0.5 million people*. J Epidemiol Community Health, 2018. **72**(10): p. 919-925.
20. Chubak, J., et al., *Risk of colon cancer recurrence in relation to diabetes*. Cancer Causes Control, 2018. **29**(11): p. 1093-1103.
21. Jurjus, A., et al., *Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links*. BBA Clin, 2016. **5**: p. 16-24.
22. Lecarpentier, Y., et al., *Interactions between PPAR Gamma and the Canonical Wnt/Beta-Catenin Pathway in Type 2 Diabetes and Colon Cancer*. PPAR Res, 2017. **2017**: p. 5879090.
23. Ancey, P.B., C. Contat, and E. Meylan, *Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment*. Febs j, 2018. **285**(16): p. 2926-2943.
24. Masur, K., et al., *Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation*. Br J Cancer, 2011. **104**(2): p. 345-52.
25. Schwartz, L., C.T. Supuran, and K.O. Alfarouk, *The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer*. Anticancer Agents Med Chem, 2017. **17**(2): p. 164-170.

26. Webb, B.A., et al., *Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(9): p. 671-7.
27. Chen, Y.C., et al., *High Glucose Concentrations Negatively Regulate the IGF1R/Src/ERK Axis through the MicroRNA-9 in Colorectal Cancer*. Cells, 2019. **8**(4): p. 326.
28. Wu, J., et al., *High glucose induces epithelial-mesenchymal transition and results in the migration and invasion of colorectal cancer cells*. Exp Ther Med, 2018. **16**(1): p. 222-230.
29. Garufi, A. and G. D'Orazi, *High glucose dephosphorylates serine 46 and inhibits p53 apoptotic activity*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. **33**: p. 79.
30. Wang, Y., Z. Wu, and L. Hu, *The regulatory effects of metformin on the [SNAIL/miR-34]:[ZEB/miR-200] system in the epithelial-mesenchymal transition(EMT) for colorectal cancer(CRC)*. Eur J Pharmacol, 2018. **834**: p. 45-53.
31. Tan, W., et al., *MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy*. Oncol Lett, 2018. **15**(3): p. 2735-2742.
32. Wang, Y., et al., *Glucagon-induced angiogenesis and tumor growth through the HIF-1-VEGF-dependent pathway in hyperglycemic nude mice*. Genet Mol Res, 2014. **13**(3): p. 7173-83.
33. Hope, C., et al., *Relationship between HbA1c and cancer in people with or without diabetes: a systematic review*. Diabet Med, 2016. **33**(8): p. 1013-25.
34. Wojciechowska, J., et al., *Diabetes and Cancer: a Review of Current Knowledge*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2016. **124**(5): p. 263-75.
35. Kabat, G.C., et al., *A longitudinal study of serum insulin and glucose levels in relation to colorectal cancer risk among postmenopausal women*. Br J Cancer, 2012. **106**(1): p. 227-32.
36. Vulcan, A., J. Manjer, and B. Ohlsson, *High blood glucose levels are associated with higher risk of colon cancer in men: a cohort study*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 842.
37. Xu, J., et al., *Association between markers of glucose metabolism and risk of colorectal cancer*. BMJ Open, 2016. **6**(6): p. 011430.
38. Shin, H.Y., et al., *Association between fasting serum glucose levels and incidence of colorectal cancer in Korean men: the Korean Cancer Prevention Study-II*. Metabolism, 2014. **63**(10): p. 1250-6.
39. Gunter, M.J., et al., *Insulin, insulin-like growth factor-I, endogenous estradiol, and risk of colorectal cancer in postmenopausal women*. Cancer Res, 2008. **68**(1): p. 329-37.
40. Limburg, P.J., et al., *Insulin, glucose, insulin resistance, and incident colorectal cancer in male smokers*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(12): p. 1514-21.
41. Stocks, T., et al., *Metabolic factors and the risk of colorectal cancer in 580,000 men and women in the metabolic syndrome and cancer project (Me-Can)*. Cancer, 2011. **117**(11): p. 2398-407.
42. Tsushima, M., et al., *Prospective study of the association of serum triglyceride and glucose with colorectal cancer*. Dig Dis Sci, 2005. **50**(3): p. 499-505.
43. Hirsch, H.A., D. Iliopoulos, and K. Struhl, *Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(3): p. 972-7.
44. Brower, V., *Illuminating the diabetes-cancer link*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(14): p. 1048-50.
45. Sabatino, L., et al., *PPARG Epigenetic Deregulation and Its Role in Colorectal Tumorigenesis*. PPAR Res, 2012. **2012**: p. 687492.
46. Lehrke, M. and M.A. Lazar, *The many faces of PPARgamma*. Cell, 2005. **123**(6): p. 993-9.
47. Sabatino, L., et al., *Emerging role of the beta-catenin-PPARGgamma axis in the pathogenesis of colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(23): p. 7137-51.
48. Savage, D.B., *PPAR gamma as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology*. Expert Rev Mol Med, 2005. **7**(1): p. 1-16.
49. Roberts-Thomson, S.J., *Peroxisome proliferator-activated receptors in tumorigenesis: targets of tumour promotion and treatment*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(4): p. 436-41.

50. Bandera Merchan, B., F.J. Tinahones, and M. Macias-Gonzalez, *Commonalities in the Association between PPARG and Vitamin D Related with Obesity and Carcinogenesis*. PPAR Res, 2016. **2016**: p. 2308249.
51. Lecarpentier, Y., et al., *Thermodynamics in cancers: opposing interactions between PPAR gamma and the canonical WNT/beta-catenin pathway*. Clin Transl Med, 2017. **6**(1): p. 14.
52. Pancione, M., et al., *Reduced beta-catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor-associated macrophages, cyclooxygenase 2, and patient outcome*. Hum Pathol, 2009. **40**(5): p. 714-25.
53. Thompson, E.A., *PPARgamma physiology and pathology in gastrointestinal epithelial cells*. Mol Cells, 2007. **24**(2): p. 167-76.
54. Sarraf, P., et al., *Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer*. Mol Cell, 1999. **3**(6): p. 799-804.
55. Capaccio, D., et al., *A novel germline mutation in peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene associated with large intestine polyp formation and dyslipidemia*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(6): p. 572-81.
56. McAlpine, C.A., et al., *Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice*. Int J Cancer, 2006. **119**(10): p. 2339-46.
57. Osawa, E., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice*. Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 361-7.
58. Takahashi, H., et al., *PPARgamma Ligand as a Promising Candidate for Colorectal Cancer Chemoprevention: A Pilot Study*. PPAR Res, 2010. **2010**: p. 257835.
59. Ueno, T., et al., *Suppressive effect of pioglitazone, a PPAR gamma ligand, on azoxymethane-induced colon aberrant crypt foci in KK-Ay mice*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(8): p. 4067-73.
60. Kohno, H., et al., *Troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, inhibits chemically-induced aberrant crypt foci in rats*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(4): p. 396-403.
61. Lefebvre, A.M., et al., *Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1053-7.
62. Saez, E., et al., *Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1058-61.
63. Chen, S.W., et al., *Use of thiazolidinediones and the risk of colorectal cancer in patients with diabetes: a nationwide, population-based, case-control study*. Diabetes Care, 2013. **36**(2): p. 369-75.
64. Chang, C.H., et al., *Association of thiazolidinediones with liver cancer and colorectal cancer in type 2 diabetes mellitus*. Hepatology, 2012. **55**(5): p. 1462-72.
65. Govindarajan, R., et al., *Thiazolidinediones and the risk of lung, prostate, and colon cancer in patients with diabetes*. J Clin Oncol, 2007. **25**(12): p. 1476-81.
66. Monami, M., et al., *Rosiglitazone and risk of cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials*. Diabetes Care, 2008. **31**(7): p. 1455-60.
67. Vallee, A., et al., *Opposite Interplay Between the Canonical WNT/beta-Catenin Pathway and PPAR Gamma: A Potential Therapeutic Target in Gliomas*. Neurosci Bull, 2018. **34**(3): p. 573-588.
68. Neumann, J., et al., *SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 518.
69. Zhang, X.H., et al., *The association of SOX2 with clinical features and prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis*. Pathol Res Pract, 2020. **216**(1): p. 152769.
70. Vallee, A. and Y. Lecarpentier, *Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/beta-Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 745.

71. Morrison, R.F. and S.R. Farmer, *Role of PPAR γ in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis.* J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17088-97.
72. Wakino, S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1 \rightarrow S transition in vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22435-41.
73. Altioek, S., M. Xu, and B.M. Spiegelman, *PPAR γ induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A.* Genes Dev, 1997. **11**(15): p. 1987-98.
74. Fujita, M., et al., *Cytotoxicity of troglitazone through PPAR γ -independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma.* Cancer Lett, 2011. **312**(2): p. 219-27.
75. Elnemr, A., et al., *PPAR γ ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells.* Int J Oncol, 2000. **17**(6): p. 1157-64.
76. Jiang, Y., et al., *PPAR γ and Wnt/beta-Catenin pathway in human breast cancer: expression pattern, molecular interaction and clinical/prognostic correlations.* J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(11): p. 1551-9.
77. Choi, I.K., et al., *PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo.* Invest New Drugs, 2008. **26**(3): p. 283-8.
78. Rochel, N., et al., *Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 253.
79. Zou, Y., et al., *Polyunsaturated Fatty Acids from Astrocytes Activate PPAR γ Signaling in Cancer Cells to Promote Brain Metastasis.* Cancer Discov, 2019. **9**(12): p. 1720-1735.
80. Aires, V., et al., *A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis.* Mol Nutr Food Res, 2014. **58**(9): p. 1785-94.
81. Ji, X.X., et al., *Rosiglitazone Reduces Apoptosis and Inflammation in Lipopolysaccharide-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells.* Med Sci Monit, 2018. **24**: p. 6200-6207.
82. Wu, J.S., T.N. Lin, and K.K. Wu, *Rosiglitazone and PPAR-gamma overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins.* J Cell Physiol, 2009. **220**(1): p. 58-71.
83. Lin, M.S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth via apoptosis and arrest of the cell cycle in human colorectal cancer.* J Dig Dis, 2007. **8**(2): p. 82-8.
84. Toyoda, M., et al., *A ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells.* Gut, 2002. **50**(4): p. 563-7.
85. D'Arcy, M.S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy.* Cell Biol Int, 2019. **43**(6): p. 582-592.
86. Park, J.I. and J.Y. Kwak, *The role of peroxisome proliferator-activated receptors in colorectal cancer.* PPAR Res, 2012. **2012**: p. 876418.
87. Lau, M.F., et al., *Rosiglitazone enhances the apoptotic effect of 5-fluorouracil in colorectal cancer cells with high-glucose-induced glutathione.* Sci Prog, 2019: p. 36850419886448.
88. Ma, J., et al., *Fibroblast-derived CXCL12 regulates PTEN expression and is associated with the proliferation and invasion of colon cancer cells via PI3k/Akt signaling.* Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 119.
89. Galbraith, L.C.A., et al., *PPAR-gamma induced AKT3 expression increases levels of mitochondrial biogenesis driving prostate cancer.* Oncogene, 2021. **40**(13): p. 2355-2366.
90. Reka, A.K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition.* Mol Cancer Ther, 2010. **9**(12): p. 3221-32.
91. Hawinkels, L.J., et al., *Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts.* Oncogene, 2014. **33**(1): p. 97-107.
92. Sippel, T.R., et al., *Activation of PPAR γ in Myeloid Cells Promotes Progression of Epithelial Lung Tumors through TGF β 1.* Mol Cancer Res, 2019. **17**(8): p. 1748-1758.

93. Liu, R.Z., et al., *The FABP12/PPAR γ pathway promotes metastatic transformation by inducing epithelial-to-mesenchymal transition and lipid-derived energy production in prostate cancer cells*. Mol Oncol, 2020. **14**(12): p. 3100-3120.
94. Di Gregorio, J., et al., *Role of glycogen synthase kinase-3 β and PPAR- γ on epithelial-to-mesenchymal transition in DSS-induced colorectal fibrosis*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. 0171093.
95. Lamalice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot, *Endothelial cell migration during angiogenesis*. Circ Res, 2007. **100**(6): p. 782-94.
96. Unterleuthner, D., et al., *Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer*. Angiogenesis, 2019: p. 10456.
97. Goetze, S., et al., *PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(5): p. 1431-7.
98. Yang, L., et al., *Knockdown of PPAR delta gene promotes the growth of colon cancer and reduces the sensitivity to bevacizumab in nude mice model*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60715.
99. Yamakawa, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(3): p. 571-4.
100. Chintalgattu, V., et al., *PPAR- γ agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(1): p. 140-50.
101. Wang, H., et al., *LYW-6, a novel cryptotanshinone derived STAT3 targeting inhibitor, suppresses colorectal cancer growth and metastasis*. Pharmacol Res, 2020. **153**: p. 104661.
102. Fagotto, F., U. Glück, and B.M. Gumbiner, *Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin*. Curr Biol, 1998. **8**(4): p. 181-90.
103. Neumann, J., et al., *A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer*. Histopathology, 2012. **60**(3): p. 416-26.
104. Panza, A., et al., *Interplay between SOX9, beta-catenin and PPAR γ activation in colorectal cancer*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(8): p. 1853-65.
105. Ormanns, S., et al., *WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear beta-Catenin depend on active PI3K signaling*. Oncotarget, 2014. **5**(10): p. 2999-3011.
106. Vallee, A., et al., *Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis*. Oncotarget, 2017. **8**(52): p. 90579-90604.
107. Lu, H., et al., *Dickkopf-1 promotes the differentiation and adipocytokines secretion via canonical Wnt signaling pathway in primary cultured human preadipocytes*. Obes Res Clin Pract, 2016. **10**(4): p. 454-64.
108. Sadanandam, A., et al., *A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 619-25.
109. Woischke, C., et al., *High PPARG expression is associated with pulmonary metastasis in colorectal cancer (CRC) and better overall survival within the subgroup of CRC patients with isolated pulmonary metastasis*, in *Virtuelle Pathologietage der DGP 2021*. 2021. p. 25.
110. Rassow, J., *Biochemie*. 2016, Stuttgart: Thieme. 590-591.
111. Renshaw, S., *Immunohistochemistry and immunocytochemistry*. 2017, Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell. 1-227.
112. Thomas, B., *Basic Immunocytochemistry*, in *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods*, C. Taylor and L. Rudbeck, Editors. 2013, Dako. p. 218.
113. Siemens, H., et al., *Detection of miR-34a promoter methylation in combination with elevated expression of c-Met and beta-catenin predicts distant metastasis of colon cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(3): p. 710-20.
114. Uddin, S., et al., *Inhibition of c-MET is a potential therapeutic strategy for treatment of diffuse large B-cell lymphoma*. Lab Invest, 2010. **90**(9): p. 1346-56.
115. Young, L., et al., *Detection of Mycoplasma in cell cultures*. Nat Protoc, 2010. **5**(5): p. 929-34.

116. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
117. Maniatis, E.F.F., J. Sambrook, *Molecular cloning*. 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Getr. Zählung.
118. Hannus, M., et al., *siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 8049-61.
119. Varley, C.L. and J. Southgate, *Effects of PPAR agonists on proliferation and differentiation in human urothelium*. Exp Toxicol Pathol, 2008. **60**(6): p. 435-41.
120. Rampersad, S.N., *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. Sensors (Basel), 2012. **12**(9): p. 12347-60.
121. Nagai, M., et al., *The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(10): p. 2142-50.
122. Sekulic-Jablanovic, M., et al., *Effects of peroxisome proliferator activated receptors (PPAR)- γ and - α agonists on cochlear protection from oxidative stress*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188596.
123. *The Cancer Genome Atlas Program*. 2020 06.04.2020; Available from: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>.
124. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
125. Michal, S. *Expression data from colorectal cancer patients*. 2012 1.09.2021; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE41258>.
126. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
127. Schöckel, L., et al., *PPAR γ activation promotes the proliferation of colorectal cancer cell lines and enhances the apoptotic effect of 5-Fluorouracil.*, in *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 2023. p. 97.
128. Papi, A., et al., *PPAR γ and RXR ligands disrupt the inflammatory cross-talk in the hypoxic breast cancer stem cells niche*. J Cell Physiol, 2014. **229**(11): p. 1595-606.
129. Zhao, Y.Z., et al., *Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor γ expression via HIF-1-dependent mechanisms in HepG2 cell line*. Arch Biochem Biophys, 2014. **543**: p. 40-7.
130. Galzio, R., et al., *Hypoxia modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human glioblastoma stem cells. Implications for therapy*. J Cell Biochem, 2012. **113**(11): p. 3342-52.
131. Lane, S.L., et al., *Pharmacological activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) protects against hypoxia-associated fetal growth restriction*. Faseb j, 2019. **33**(8): p. 8999-9007.
132. Biller, L.H. and D. Schrag, *Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review*. Jama, 2021. **325**(7): p. 669-685.
133. Chen, L., et al., *Identification of biomarkers associated with diagnosis and prognosis of colorectal cancer patients based on integrated bioinformatics analysis*. Gene, 2019. **692**: p. 119-125.
134. Ogino, S., et al., *Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARGgamma) is associated with good prognosis*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1242-50.
135. Theocharis, S., et al., *Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in colon cancer: correlation with histopathological parameters, cell cycle-related molecules, and patients' survival*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(9): p. 2305-11.
136. Yaghoobizadeh, M., L. Pishkar, and G. Basati, *Aberrant Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Colorectal Cancer and Their Association with Cancer Progression and Prognosis*. Gastrointest Tumors, 2020. **7**(1-2): p. 11-20.
137. Lu, T.X. and M.E. Rothenberg, *MicroRNA*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(4): p. 1202-1207.
138. Wang, J., et al., *Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis*. Cancer Med, 2020. **9**(1): p. 361-373.

139. Girnun, G., *PPARG: a new independent marker for colorectal cancer survival*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1157-60.
140. Gustafsson, A., et al., *EP1-4 subtype, COX and PPAR gamma receptor expression in colorectal cancer in prediction of disease-specific mortality*. Int J Cancer, 2007. **121**(2): p. 232-40.
141. Bondi, J., et al., *Expression of non-membranous beta-catenin and gamma-catenin, c-Myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas*. Apmis, 2004. **112**(1): p. 49-56.
142. Wong, S.C., et al., *Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1401-8.
143. Krishnamurthy, N. and R. Kurzrock, *Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors*. Cancer Treat Rev, 2018. **62**: p. 50-60.
144. Girnun, G.D., et al., *APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13771-6.
145. Liu, J., et al., *Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5827-37.
146. Gustafson, B., B. Eliasson, and U. Smith, *Thiazolidinediones increase the wingless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis*. Diabetologia, 2010. **53**(3): p. 536-40.
147. Engeland, K., *Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 114-132.
148. Goh, H.S., J. Yao, and D.R. Smith, *p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5217-21.
149. Han, C., et al., *PPARgamma ligands inhibit cholangiocarcinoma cell growth through p53-dependent GADD45 and p21 pathway*. Hepatology, 2003. **38**(1): p. 167-77.
150. Bonofiglio, D., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3083-92.
151. Nagamine, M., et al., *PPAR gamma ligand-induced apoptosis through a p53-dependent mechanism in human gastric cancer cells*. Cancer Sci, 2003. **94**(4): p. 338-43.
152. Shamloo, B. and S. Usluer, *p21 in Cancer Research*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8): p. 1778.
153. Lin, J., et al., *PPARG rs3856806 C>T Polymorphism Increased the Risk of Colorectal Cancer: A Case-Control Study in Eastern Chinese Han Population*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 63.
154. Tsukahara, T., et al., *Cyclic phosphatidic acid decreases proliferation and survival of colon cancer cells by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor γ* . Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2010. **93**(3-4): p. 126-33.
155. Takano, S., et al., *Pioglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma acts as an inhibitor of colon cancer liver metastasis*. Anticancer Res, 2008. **28**(6a): p. 3593-9.
156. Papi, A., et al., *RXRgamma and PPARgamma ligands in combination to inhibit proliferation and invasiveness in colon cancer cells*. Cancer Lett, 2010. **297**(1): p. 65-74.
157. D'Onofrio, N., et al., *SIRT3 and Metabolic Reprogramming Mediate the Antiproliferative Effects of Whey in Human Colon Cancer Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(20): p. 5196.
158. Tsukahara, T. and H. Haniu, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression suppresses proliferation of human colon cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **424**(3): p. 524-9.
159. Li, X., et al., *Hypoxia reduces the expression and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human proximal renal tubular cells*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(4): p. 1041-51.
160. Zhang, Q., et al., *PPAR γ Antagonizes Hypoxia-Induced Activation of Hepatic Stellate Cell through Cross Mediating PI3K/AKT and cGMP/PKG Signaling*. PPAR Res, 2018. **2018**: p. 6970407.
161. Kang, B.Y., et al., *The PPAR γ ligand rosiglitazone attenuates hypoxia-induced endothelin signaling in vitro and in vivo*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(6): p. L881-91.

162. Wnuk, A., et al., *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR γ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. *Biomedicines*, 2021. **9**(8).
163. Poyton, R.O., K.A. Ball, and P.R. Castello, *Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling*. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. **20**(7): p. 332-40.
164. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. *Free Radic Res*, 2010. **44**(5): p. 479-96.
165. Hua, B., et al., *Protective role of activating PPAR γ in advanced glycation end products-induced impairment of coronary artery vasodilation via inhibiting p38 phosphorylation and reactive oxygen species production*. *Biomed Pharmacother*, 2022. **147**: p. 112641.
166. Li, Z., et al., *PPAR γ Alleviates Sepsis-Induced Liver Injury by Inhibiting Hepatocyte Pyroptosis via Inhibition of the ROS/TXNIP/NLRP3 Signaling Pathway*. *Oxid Med Cell Longev*, 2022. **2022**: p. 1269747.
167. Deng, S., et al., *UCP2 inhibits ROS-mediated apoptosis in A549 under hypoxic conditions*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30714.
168. Chan, S.H., et al., *Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 2010. **55**(6): p. 1444-53.
169. Bugge, A., et al., *A novel intronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhancer in the uncoupling protein (UCP) 3 gene as a regulator of both UCP2 and -3 expression in adipocytes*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(23): p. 17310-7.
170. Diasio, R.B. and B.E. Harris, *Clinical pharmacology of 5-fluorouracil*. *Clin Pharmacokinet*, 1989. **16**(4): p. 215-37.
171. Dean, L. and M. Kane, *Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype*, in *Medical Genetics Summaries*. 2012, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
172. Zhang, Y.Q., et al., *Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(10): p. 1534-40.
173. Nita, M.E., et al., *5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins*. *Br J Cancer*, 1998. **78**(8): p. 986-92.
174. Pishvaian, M.J., et al., *A phase 1 study of efatutazone, an oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, administered to patients with advanced malignancies*. *Cancer*, 2012. **118**(21): p. 5403-13.
175. Komatsu, Y., et al., *Phase 1 study of efatutazone, a novel oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, in combination with FOLFIRI as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer*. *Invest New Drugs*, 2014. **32**(3): p. 473-80.
176. Rowan, A.J., et al., *APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits"*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3352-7.
177. Holch, J.W., et al., *[Precision Oncology and "Molecular Tumor Boards" - Concepts, Chances and Challenges]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2017. **142**(22): p. 1676-1684.
178. Pinedo, H.M. and G.F. Peters, *Fluorouracil: biochemistry and pharmacology*. *J Clin Oncol*, 1988. **6**(10): p. 1653-64.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens Neumann, für seine hervorragende Unterstützung und Expertise in allen Belangen meiner Dissertation. Seine zahlreichen und hilfreichen Ratschläge, Ideen sowie auch die kritische Sicht auf die Themen dieser Arbeit, gaben mir während des gesamten Forschungsprojektes viel Motivation.

Widmen möchte ich diese Arbeit Frau Dr. med. Christine Woischke, von der die ursprüngliche Idee des Forschungsprojektes stammt und die mich mit ihrer inspirierenden fröhlichen Art immer an das Projekt glauben lies und mich während der gesamten Jahre in allen Belangen der Arbeit unterstützte. An deine warme, herzliche Art werde ich immer zurückdenken.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Steffen Ormanns bedanken, der mich mit viel Geduld in die vielen Methoden der Laborarbeit eingearbeitet hat, immer ein offenes Ohr für etwaige Schwierigkeiten hatte und mir stets geholfen hat, den Faden des Forschungsprojektes nicht zu verlieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben bedanken. Insbesondere Michael Günther, der immer wieder Vorschläge und Ideen für die Umsetzung der Laborarbeit lieferte und mit seiner direkten ehrlichen Art eine große Hilfe war.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitbetreuern Prof. Dr. med. Tobias Schiergens und PD Dr. med. Marlies Michl für die Betreuung und die hilfreichen Anregungen während der gesamten Zeit bedanken. Auch möchte ich mich bei den Kooperationspartnern Dr. med. Florian Glass, Dr. med. Andreas Hölscher und Dr. med. Peter Kreissl für die unkomplizierte und schnelle Hilfe bei der Datenerfassung bedanken.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Schöckel, Leah

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung des Zusammenhanges von Diabetes mellitus Typ II und Kolorektalen Karzinomen (KRK) mit besonderem Fokus auf Analysen zur Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR γ

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.11.2023

Leah Schöckel

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

Teile der Dissertationen wurden bereits im Rahmen von Vorträgen auf der Jahrestagung der deutschen Pathologiegesellschaft vorgestellt:

Abstract und Präsentation an der DGP Jahrestagung 2023:

L. Schöckel, C. Woischke, M. Günther, S. Ormanns, J. Neumann

Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany

„PPAR γ activation promotes the proliferation of colorectal cancer cell lines and enhances the apoptotic effect of 5-Fluorouracil”

Abstract und Präsentation an der DGP Jahrestagung 2021:

C. Woischke¹, **L. Schöckel**¹, S. Ormanns¹, M. Michl², V. Heinemann³, T. Schiergens⁴, P. Kreissl⁵, F. Glass⁶, A.Hölscher⁶, T. Kirchner¹, F. Klauschen¹, J. Neumann¹

¹Pathologisches Institut der LMU München, München, Deutschland, ²Klinikum der LMU, Medizinische Klinik und Poliklinik III, München, Deutschland, ³Klinikum der Universität München, LMU, Medizinische Klinik und Poliklinik III, München, Deutschland, ⁴Klinikum der LMU, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, München, Deutschland, ⁵Kreisklinik Ebersberg, Ebersberg, Deutschland, ⁶Maria-Theresia-Klinik, München, Deutschland

„High PPARG expression is associated with pulmonal metastasis in colorectal cancer (CRC) and better overall survival within the subgroup of CRC patients with isolated pulmonary metastasis“